

R  
008.8  
4648

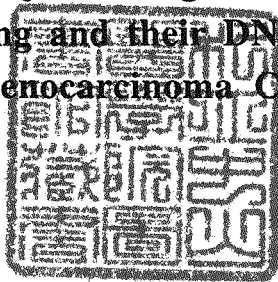
# 中山醫學院生化學研究所碩士論文

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

指導教授：李 輝 博士 ( H. Lee, Ph.D. )  
王 憶 卿 博士 ( Y. C. Wang, Ph.D. )

油煙萃取物中主要致突變物之鑑定及其對  
臺灣肺腺癌 CL-3 細胞造成 DNA 傷害之研究

Identification of Major Mutagenic Compounds in Oil Smoke  
from Cooking and their DNA Damages on Lung  
Adenocarcinoma CL-3 Cells



研究生：楊 森 智 (Sen-Chih Yang) 撰

中華民國八十六年七月  
(JULY.1997)

中山醫學院圖書館



C046148

參考書恕不外借

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 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 油煙萃取物中主要致突變物之鑑定及其對臺灣肺腺癌CL-3細胞造成  
DNA傷害之研究

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

研究生簽名: 楊森智 學號: R84206  
(親筆正楷)

日期: 民國 86 年 7 月 11 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選, 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鉤選並填妥各項資料。
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: 楊和知 聯絡電話: (06)2584395  
2592564

地址: 台南市北區和緯路四段117巷43號

油煙萃取物中主要致突變物之鑑定及其對  
臺灣肺腺癌 CL-3 細胞造成 DNA 傷害之研究

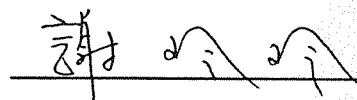
**Identification of Major Mutagenic Compounds in Oil  
Smogs from Cooking and their DNA Damages on  
Lung Adenocarcinoma CL-3 Cells**

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

長庚醫工學院醫學院公共衛生學科

謝玲玲 博士




中興大學食品科學研究所

胡森琳 博士



中山醫學院毒理學研究所

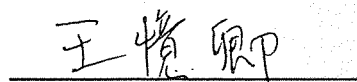
林嬪嬪 博士



中山醫學院毒理學研究所

王憶卿 博士

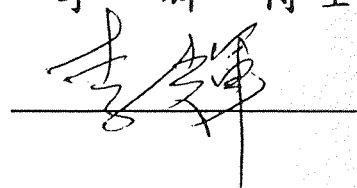
(本論文共同指導教授)



中山醫學院生物化學研究所

李輝 博士

(本論文指導教授)



中華民國八十六年七月八日

學生楊森智論文題目為油煙萃取物中主要致突變物之鑑定及其對臺灣肺腺癌 CL-3 細胞造成 DNA 傷害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

共同指導教授：王 憶 卿 博士 簽名：王憶卿

中華民國八十六年七月十一日

## 謝 誌

兩年碩士研究生活結束了，心中萬般地不捨！打從進實驗室的第一天就深深地愛上這裡的每一個人，因著和指導教授相同的實驗理念而進中山醫，感謝神的帶領，十分高興這樣的選擇，著實超乎自己所求所想的。如今數算走過的每一足跡，都是恩典滿滿，實在是得之於人者太多，出之於己者太少！

首先，感謝恩師 李輝教授不但為我們提供如此優渥的研究環境，常常不厭其煩地授業、解惑、啓迪與薰陶，使我們可以盡情地徜徉在研究的樂趣中。在生活中更是常如父親般地關懷與鼓勵，往往語重心長、苦口婆心，無非希望每一個受教的學生都能成大器。於論文撰寫期間，更是不辭辛勞地圈點眉批，悉心斧正，雖然學生資質愚昧，常反其意而行，但恩師仍耐心地包容與指導。實讓不才的學生，熱眶滿盈。感激之情，溢於言表，師恩浩瀚，永銘在心，僅與卷首致上最深的敬意與謝忱。

感謝恩師 王憶卿博士，這兩年來的教誨與關愛，愛護之情，由衷感激不已，從學術研究上的指導、生活上的鼓勵到論文的修改點滴在心頭，在此獻上學生深摯地謝意。

文稿初成，承蒙謝玲玲教授、胡淼琳教授以及林嬪嬪副教授撥冗審閱，詳加斧正並提供許多寶貴的意見，在此謹申由衷敬謝。

研究期間，承蒙靜宜大學林孝道教授在質譜與 IR 方面協助分析，感謝郝菊副教授在研究上的鼓勵、生活上的關心及信仰上的分享與代禱，邊樹萱老師於實驗上的協助與生活上的照料，林嬪嬪副教授在實驗上的建議與生活上的照料特別在論文撰寫期間幾乎天天陪我吃晚餐及買了好多的補品為我打氣，感激之心，無法言述。感謝博士後研究員鄭信男學長、中興食科所石名貴學長、康志強學長、清華生科所程淑慧學姊、以及楊忠錡、陳建仲、王文澈、黃建富、陳兆平、湯德璋等學長姐，在實驗上的指導與協助及生活上的關心，銘感五內，並致最誠摯的謝意。也特

別感謝這群可愛非凡的學弟妹們：玉怡、君璇、雅文、天福、元衍、秀仁、剛璋、星光、國豪、玉緣、容奇、玉華、怡如、秋月、學樑、朝聰、雅梅等（族繁不及備載），在實驗上與生活上的協助，還有許多陪我一路走來的同學、朋友，在此一併致深深的謝意。此外，更感謝台南看西接教會、台中思恩堂及中興校園團契等主內弟兄姊妹們的扶持與代禱，「因為所賜給我們的聖靈，將神的愛澆灌在我們心裡」讓我更能靠主奔跑得勝。

最後，將此小小努力的成果，獻得我最最最愛家人及雅晴，特別是父母，感謝您們的付出與諒解。以及常常在禱告中的紀念，使我享受上帝豐盛的恩典，我永遠深愛你們！願一切榮耀頌讚都歸於至高真神耶和華！

楊森智 謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

中華民國八十六年七月十日

油煙萃取物中主要致突變物之鑑定及其對  
臺灣肺腺癌 CL-3 細胞造成 DNA 傷害之研究

Identification of Major Mutagenic Compounds in Oil Smoke  
from Cooking and their DNA Damages on Lung  
Adenocarcinoma CL-3 Cells

壹、中文摘要	(1)
貳、文獻綜論	(4)
一、前言	(4)
二、油煙與肺癌之關係的流行病學證據	(5)
三、烹調油煙的來源	(6)
四、烹調油煙的生物毒性	(6)
五、烹調油煙的污染種類	(7)
(一) 多環芳香烴 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)	(7)
1. 來源與分佈	(7)
2. 物化性與生成機制	(8)
3. 致癌作用之機制	(10)
4. 其他生物毒性	(11)
(二) 硝基多環芳香烴 (Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitro-PAHs)	(13)
1. 來源與分佈	(13)



2. 代謝活化-----	(14)
3. 生物毒性-----	(15)
(三) 異環胺類 (Heterocyclic amines,HAs)-----	(16)
1. 來源與分佈-----	(16)
2. 代謝活化-----	(18)
3. 生物毒性-----	(19)
參、研究動機-----	(22)
肆、材料與方法-----	(25)
一、化學藥品與材料-----	(25)
二、煎魚和炒豬肉油煙的製備與基因毒物之萃取-----	(26)
三、樣品之純化-----	(27)
1. Baker-10 管柱純化 PAHs-----	(27)
2. 半製備型 HPLC 與分析級 HPLC 純化分析 Nitro-PAHs-----	(27)
四、肝臟微粒體酵素 (S9 fraction) 之製備-----	(28)
五、致突變性之測定-----	(28)
六、PAHs 之 HPLC 分析-----	(29)
七、PAHs 之 GC 分析-----	(30)
八、臺灣肺腺癌 CL-3 細胞之培養-----	(30)
九、細胞解凍與保存-----	(31)

十、DNA 的萃取與純化-----	(32)
十一、以 $^{32}\text{P}$ -postlabeling 方法分析 DNA 鍵結物-----	(32)
(一) PAHs-DNA 鍵結物之分析-----	(32)
1. In vitro PAH-DNA 鍵結物之合成-----	(32)
2. 煎魚油煙萃取物處理小牛胸腺 DNA-----	(33)
3. 煎魚油煙萃取物處理 CL-3 細胞-----	(33)
4. DNA 鍵結物之分析-----	(33)
(二) Nitro-PAHs-DNA 鍵結物之分析-----	(34)
1. In vitro Dinitropyrene-DNA 鍵結物之合成-----	(34)
2. 煎魚油煙萃取物處理小牛胸腺 DNA-----	(35)
3. 煎魚油煙萃取物處理 CL-3 細胞-----	(35)
4. DNA 鍵結物之分析-----	(35)
(三) Malondialdehyde(MDA)-DNA 鍵結物之 $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分 析-----	(36)
1. MDA-DNA 鍵結物之合成-----	(36)
2. 煎魚油煙萃取物處理 CL-3 細胞-----	(37)
3. DNA 鍵結物之分析-----	(37)
十二、HPLC 分析煎魚油煙在 CL-3 細胞所形成 PAH-DNA 鍵結物 -----	(38)
十三、LC-MS 鑑定煎魚油煙所形成鍵結物-----	(39)
1. 鑑定在 CL-3 所形成之主要 PAH-DNA 鍵結物-----	(39)

2. 鑑定在 CL-3 所形成之 MDA-DNA 鍵結物-----	(39)
十四、 TBA 方法測定 MDA 之生成-----	(39)
1. 處理小牛胸腺 DNA-----	(40)
2. 處理 CL-3 細胞-----	(40)
十五、 Xanthine oxidase 活性之分析-----	(41)
十六、 8-OH-deoxyguanosine 之分析-----	(41)
1. 處理小牛胸腺 DNA-----	(41)
2. 處理 CL-3 細胞-----	(41)
3. ECD/UV HPLC 之分析-----	(42)
4. LC-MS 之分析-----	(42)
十七、 細胞 p53 蛋白之免疫染色分析 (Immunocytostaining)-----	(42)
十八、 DNA 單股斷裂之氧化性傷害分析-----	(43)
十九、 自由基對 DNA 鍵結物形成的影響之分析-----	(44)
伍、 結果與討論-----	(45)
一、 炒肉油煙之收集與萃取-----	(45)
(一) 比較豬肉與魚肉油煙懸浮微粒含量和其丙酮萃取物-----	(45)
二、 油煙萃取物中主要直接致突變物之分析與鑑定-----	(46)
(一) 直接致突變性分析-----	(46)
(二) 油煙萃取物中主要直接致突變物之純化-----	(47)
1. 半製備型管柱之 HPLC 純化-----	(47)

2. 1,6-DNP-DNA 鍵結物之分析-----	(48)
3. 1,6-DNP-DNA 鍵結物之質譜 (LC-MS spectra) 鑑定-----	(49)
4. 分析級管柱之 HPLC 純化-----	(51)
5. UV 吸收光譜分析-----	(53)
6. 紅外線吸收光譜 (Infrared spectrophotometry: IR) 與質譜 (LC-MS spectra) 之鑑定-----	(53)
三、油煙萃取物中主要間接型致突變物之鑑定-----	(56)
(一) 煎魚油煙萃取物在沙門氏桿菌 TA98 與 TA100 之致突變 性分析-----	(57)
(二) 油煙萃取物中多環芳香煙之鑑定-----	(58)
1. 油煙萃取物中多環芳香煙之純化-----	(59)
2. 油煙萃取物中多環芳香煙之氣相層析儀 (GC) 定性分析 -----	(59)
3. 油煙萃取物中多環芳香煙之 HPLC 定量分析-----	(60)
四、油煙萃取物在臺灣肺腺癌 CL-3 細胞所造成主要 DNA 鍵結 物之鑑定-----	(63)
(一) 以 $^{32}\text{P}$ -postlabeling 方法分析 DNA 鍵結物-----	(63)
1. 油煙萃取物與小牛胸腺 DNA 所形成之鍵結物分析-----	(63)
2. 油煙萃取物在 CL-3 細胞所形成之鍵結物分析-----	(64)
(二) 以 HPLC 鑑定 DNA 鍵結物-----	(66)
(三) 以 LC-MS 鑑定 DNA 鍵結物-----	(67)
五、雌性激素在肺腺癌細胞 CL-3 中對油煙所形成鍵結物的影響	(71)

六、油煙萃取物對臺灣肺腺癌 CL-3 細胞所產生內生性基因傷害之研究-----	(73)
(一) 油煙萃取物對 Xanthine oxidase 活性的影響-----	(74)
(二) 油煙萃取物造成脂質過氧化生成 MDA(malondialdehyde) 之分析-----	(75)
(三) 油煙萃取物造成內生性 MDA 鍵結物之研究-----	(77)
1. MDA-DNA 鍵結物標準品之合成與分析-----	(77)
2. 細胞中 MDA-DNA 鍵結物之分析-----	(78)
3. 以 LC-MS 鑑定 MDA-DNA 鍵結物-----	(78)
(四) 油煙萃取物造成 DNA 氧化性傷害之研究-----	(80)
1. 對細胞造成 DNA 單股斷裂傷害之分析-----	(81)
2. 8-OH dG(8-hydroxy deoxyguanosine) 生成之分析-----	(81)
(1) ECD/UV HPLC 偵測 8-OH dG 生成-----	(81)
(2) LC-MS 偵測 8-OH dG 生成-----	(82)
(五) 油煙萃取物所產生氧化性傷害與 PAH-DNA 鍵結物之關係-----	(84)
1. 自由基清除劑 (radical scavenger) ascorbate 與 PAH-DNA 鍵結物之關係-----	(84)
2. 自由基與 DNA 鍵結物之關係-----	(85)
3. MDA-DNA 鍵結物與 PAH-DNA 鍵結物之關係-----	(86)
(六) 油煙萃取物對臺灣肺腺癌 CL-3 細胞中 p53 蛋白的影響-----	(87)

陸、參考文獻	(91)
柒、圖表	(114)
一、Tables	(114)
二、Figures	(134)
捌、英文摘要	(173)
玖、個人資料	(175)

## ABBREVIATIONS

Acenaphthylene	Acen
2-acetoxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline	N-acetoxy-IQ
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	4-MeIQx
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline	IQ
Anthracene	Anth
anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[ <i>a</i> ]pyrene ( B[ <i>a</i> ]P diol-epoxide )	BPDE
Benzo[ <i>a</i> ]anthracene	B[ <i>a</i> ]A
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	B[ <i>a</i> ]P
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	B[ <i>b</i> ]FA
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene diol-epoxide	BPDE
Benzo[ <i>e</i> ]pyrene	B[ <i>e</i> ]P
Benzo[ <i>g,h,i</i> ]perylene	B[ <i>g,h,i</i> ]P
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	B[ <i>k</i> ]F
Bovine serum albumin	BSA
Butylated hydroxy-toluene	BHT
Chinese hamster ovary cell	CHO cell
Chrysene	Chr
Coronene	Cor
Cyclopenta[ <i>cd</i> ]pyrene	CPP
Cytochrome P450 IA1	CYP IA1
Diagonal radioactive zone	DRZ
Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracene	DB[ <i>a,h</i> ]A
Dimethylsulfoxide	DMSO
Dinitropyrene	DNP

1,3-Dinitropyrene	1,3-DNP
1,6-Dinitropyrene	1,6-DNP
1,8-Dinitropyrene	1,8-DNP
Dithiothreitol	DTT
Fetal bovine serum	FBS
Fluoranthene	FA
Gas chromatography	GC
Glutathione S-transferase	GST
Heterocyclic amines	HA
High performance liquid chromatography	HPLC
2-hydroxamino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline	N-OH-IQ
8-hydroxy deoxyguanosine	8-OH dG
Malondialdehyde	MDA
Micrococcal endonuclease	MN
Naphthalene	Naph
N-(deoxyguanosin-8-N <sup>2</sup> -yl)-2-Amino-3,8-Dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	dG-N <sup>2</sup> -MeIQx
N-(deoxyguanosine-8-N <sup>2</sup> -yl)-anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[ <i>a</i> ]pyrene	BPDE-N <sup>2</sup> -dG
N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene	dG-C <sup>8</sup> -ANP
Nicotinamide dinucleotide phosphate	NADP <sup>+</sup>
Nitro-polycyclic aromatic hydroxycarbon	Nitro-PAH
1-Nitropyrene	1-NP
Non-essential amino acid	NEAA
Nucleotides	NT
Oil smoke condensates from cooking	OSC



Oil smoke condensates from frying fish	FOSC
Oil smoke condensates from frying pork	POSC
Phenanthrene	Phen
Phosphate buffer saline	PBS
Potato apyrase	PA
Polycyclic aromatic hydrocarbon	PAH
Purified FOSC through Baker-10 column	FOSC-B
Purified POSC through Baker-10 column	POSC-B
Nuclease P1	NP1
Pyrene	Pyr
Sister chromatid exchange	SCE
Solid Phase Extraction system	SPE
Spleen phosphodiesterase	SPD
Tetrabutylammonium chloride	TBAC
Thin-layer chromatography	TLC
Thiobarbituric acid	TBA
Trichloroacetic acid	TCA
Trypsin and EDTA	T/E

# 壹、中文摘要

流行病學調查研究結果顯示烹調所產生的油煙會引起肺癌，尤其是在中國女性肺癌發生上，可能扮演重要的角色，但一直沒有直接證據指出油煙中何種致癌物與肺癌發生有關。本研究藉著分析油煙萃取物中主要致突變物以及對台灣肺腺癌 CL-3 細胞造成 DNA 鍵結物的鑑定，並探討油煙是否會造成氧化性傷害等三方面的研究，來提出油煙對中國女性肺癌發生的毒理學上之一些可能證據。經 HPLC、Ames test、<sup>32</sup>P-postlabeling、LC-MS 一系列分析發現煎魚油煙 (FOSC) 中含有直接致突變物-1,6-DNP、nitro-naphthol，與間接致突變物-PAHs。而煎一條 260 g 的魚，5 分鐘內可產生 4.7 ng 1,6-DNP，為台灣空氣中 1,6-DNP 含量的三倍。由致突變性分析顯示 FOSC 的致突變性以間接致突變性為主，且引起結構移位突變的化合物較引起鹼基更換突變的化合物多。FOSC 中主要 PAHs 成份為 9 種 PAHs，1 mg FOSC 中約含有 1413 ng 的 PAHs，含量最多為 B[b]FA (319 ng)，佔總含量 22.68% 為 B[a]P 含量的 1.72 倍，換算成煎每條魚 (260 g) 所產生 PAHs 的量為 134.35 μg。為了瞭解 FOSC 中 PAHs 和肺癌發生的可能相關性，因此利用 <sup>32</sup>P-postlabeling 方法進行 PAH-DNA 鍵結物之分析，結果發現 9 種相同濃度的 PAHs 皆會與小牛胸腺 DNA 形成強弱不等的鍵結物，其中以 B[a]P 強度最強，且與 FOSC 所形成主要 DNA 鍵結物位置最相近。進一步處理 CL-3 細胞 24 小時，結果顯示 B[a]P 在 CL-3 細胞會產生最強的 DNA 鍵結物，其次為 B[b]FA。其他 7 種 PAHs 形成 DNA 鍵結物的能力均遠低於前兩者，甚至不會形成 DNA 鍵結物。FOSC 在 CL-3 細胞上會形成一個區域的 DNA 鍵結物，

其中主要是由一個 DNA 鍵結物所構成，佔總鍵結物強度之 70%。FOSC 造成 CL-3 細胞 PAH-DNA 鍵結物具有線性濃度關係 ( $P < 0.05$ )。比對 PEI 層析圖譜時，發現 B[a]P 與 B[b]FA 所形成 DNA 鍵結物的位置皆與 FOSC 相似。因此進一步將 B[b]FA 和 B[a]P 以及 FOSC 在 CL-3 細胞中形成之 DNA 鍵結物分別以 HPLC 分析，並以  $\beta$ -RAM 偵測器同步偵測，結果發現 FOSC 在 CL-3 細胞中主要形成 DNA 鍵結物的 PAH 為 B[a]P，其所形成之鍵結物經 LC-MS 鑑定，發現與標準品 BPDE-N<sup>2</sup>-dG 一致。另外，雌性激素 (17  $\beta$ -estradiol) 均能呈劑量關係地促進 FOSC 在細胞中產生 PAH-DNA 鍵結物。因此女性對油煙造成之 DNA 傷害的敏感度可能較男性為高。

爲了了解油煙是否會誘發內生性的 DNA 傷害，本研究分析 FOSC 對 xanthine oxidase 活性之影響，結果發現具有顯著的線性濃度效應關係 ( $P < 0.01$ )。0.5 mg FOSC 對此酵素活性較控制組增加 246 倍，因此推測 FOSC 可能會藉增加 xanthine oxidase 的活性而使細胞內生成游離基。另由 TBA assay 發現 FOSC 存在時，會誘使 CL-3 細胞發生脂質過氧化作用而產生 MDA 且具有線性濃度關係 ( $P < 0.01$ )，進而造成 DNA 氧化性傷害，產生 MDA 鍵結物，可由 <sup>32</sup>P-postlabeling 分析方法偵測到。結果發現處理 0.5 - 24 小時在細胞中皆有 MDA-DNA 鍵結物之生成，而處理 2 小時即達到最高產量 (15.8 adducts/10<sup>8</sup> NT)，而 PAHs-DNA 鍵結物在前 10 小時之內皆維持低形成量 (4-8 個/10<sup>8</sup>NT)，10 小時之後才逐漸增加，16 小時達到最高量 57.14 個/10<sup>8</sup> NT。以 LC-MS 質譜儀鑑定 MDA-DNA 鍵結物，爲 MDA-1-N<sup>2</sup>-dG。另外利用 ECD 與 UV 雙偵測器連接 HPLC 分析在銅離子存在下處理不同濃度 (0.05 ~ 2.0 mg) FOSC 的小

牛胸腺 DNA 是否會生成 8-OH-dG，結果發現皆有偵測到 8-OH-dG 且呈線性濃度效應關係 ( $P < 0.05$ )。經 LC-MS 質譜偵測 FOSC 所處理 CL-3 細胞以及小牛胸腺 DNA，結果皆有 8-OH-dG 產生，證實煎魚油煙萃取物會促使肺腺癌 CL-3 細胞產生 8-OH-dG 之氧化性傷害。進一步以自由基清除劑 (ascorbate + DTT) 分別和 FOSC 共同處理 CL-3 細胞，結果發現不同濃度的清除劑對 FOSC 以及 B[a]P 所造成的鍵結物，皆有明顯的抑制作用。同時分析 PAH-DNA 鍵結物與自由基之生成的關係，結果顯示在 0.05 mg 到 2 mg FOSC 在小牛胸腺 DNA 所造成的 PAH-DNA 鍵結物與所生成的 8-OH-dG 含量，不但兩者分別具有線性濃度效應關係，且兩者之間在統計上亦有顯著性相關 ( $P < 0.05$ )。以細胞免疫染色方法 (immunocytostaining) 進行分析 FOSC 對 CL-3 細胞中 p53 蛋白表現的影響，發現 p53 蛋白的表現隨 FOSC 濃度的增加而有逐漸減少的現象，同時在 0.01 - 1.0 mg FOSC 處理的細胞中，p53 蛋白的表現皆會隨處理的時間增加而有減少的趨勢。

綜合以上的研究結果，發現煎魚油煙萃取物中主要直接致突變物為 1,6-DNP，nitronaphthol，而間接致突變物有 9 種 PAHs 被發現，其中含量最多為 B[b]FA，攻擊 DNA 能力最強為 B[a]P。並進一步證實 FOSC 在 CL-3 細胞中會造成 DNA 傷害，可能來自兩方面，一方面為 FOSC 中所含的 PAHs 基因毒物形成 DNA 鍵結物主要以 B[a]P 所形成的 BPDE-N<sup>2</sup>-dG 為最主要且會因雌性激素存在而增強其鍵結物含量，另一方面為誘發細胞產生內生性的 DNA 傷害，而造成 MDA -DNA 鍵結物和 8-OH-dG 的形成。這些結果將有助於瞭解烹調油煙在台灣女性肺癌發生上的重要性。

## 貳、文獻綜論

### 一、前言

根據衛生署統計顯示，民國七十一年以來，惡性腫瘤一直高居台灣地區十大死因之首，其中又以肺癌的死亡率增加最為明顯，尤其是女性。由於在台灣的女性抽煙的比例較男性低的多，可是肺癌的發生率卻沒有相對的較低。顯然台灣女性有另外重要的致癌因子。癌症的發生至今已知和生活習性、飲食習慣、居住環境、職業類別等因子都有密切的關係。流行病學的研究結果顯示空氣污染較嚴重的地區，居民癌症發生的機率均較高。而當空氣污染物的暴露量減少時，肺癌的發生亦有降低的趨勢 ( Rylander,1990; Folinsbee,1992; Lewtas,1993 )。因此研究肺癌發生率與環境污染物的相關性，是近年來研究肺癌的重要課題之一。除了抽煙之外，女性經常暴露的環境污染源被懷疑可能是誘導肺癌發生的起始因子。多數中國女性整天多半的時間都待在室內做家事或活動，所以不得不重視室內污染源對女性肺癌的影響。已知室內空氣污染源，包括家庭中所使用的燃料，烹調時所產生的油煙，點燃蚊香、拜香所生成的煙霧，均是重要污染來源，而烹調準備三餐是每天都得做的事，且又以女性居多。且由過去的流行病學調查結果顯示，烹調油煙與罹患呼吸道疾病有些關係 ( Coggon *et al.*, 1986 )，也證實餐廳廚房的油煙確實具有致突變性 ( Teschke *et al.*, 1989 )，但毒理學上的證據仍顯不足，仍須進一步探討。因此，推測烹調油煙與台灣地區女性罹患肺癌之間可能有密切關係。

## 二、油煙與肺癌之關係的流行病學證據

近年來，室內空氣污染物對人體的影響愈來愈受到重視。因為大部分的人，每日70%的時間都待在室內，家庭主婦更是長達82~90%的時間(Kinouchi, *et al.*, 1988)。流行病學調查結果顯示，中國大陸地區室內空氣污染物與女性罹患肺癌有很大關聯(Liu, Q. *et al.*, 1993; Liu, *et al.*, 1991)，特別是廚房產生的空氣污染物(Liu, Q. *et al.*, 1993)。烹調所產生的油煙會引起鼻咽癌、口腔癌、膀胱癌、肺癌、胃癌和前列腺癌(Cole *et al.*, 1972; Hederson *et al.*, 1978; Dickson, 1981; Hargraves and Pariza, 1984; Hansson, *et al.*, 1993; Shirai, *et al.*, 1997)。新加坡學者發現華人廚師罹患肺癌的機率較高(Law *et al.*, 1976)。Dubrow *et al.* (1984) 和 Coggon *et al.* (1986) 也發現廚師罹患呼吸道癌症的機率也較其他癌症的機會高。Teschke *et al.*, (1989) 和 Tuchsen and Nordholm (1986) 也指出廚師及麵包烘培師罹患肺癌的危險機率較高。Gao *et al.*, (1987) 更提出中國女性抽煙比例很低僅有11.8%，但是罹患肺癌的機率竟高達19.3%，且大部分的肺癌是屬於腺腫瘤，而這種癌症和抽煙較沒有關係(Gao *et al.*, 1986)。在美國的中國女性罹患的肺癌也大多為腺腫瘤(39.3%)，其他非華人的肺癌屬於這類的腺腫瘤罹患機率僅有17.4%(Green and Brophy, 1982)。流行病學也發現，荷爾蒙因子與烹調所生成之油煙對女性肺癌可能有些相關性(Gao *et al.*, 1987)。若婦女在廚房烹調的時間愈久，則罹患肺癌的機率愈高，同時也發現若廚房改善通風設備後，會明顯降低罹患肺癌的危險率(Liu, Q. *et al.*, 1993)。因此由以上流行病學研究結果顯示，烹調與中國女性肺癌

的發生可能有關。

### 三、烹調油煙的來源

肉類經油煎會產生梅納反應或非酵素的化學反應而生成呈褐色之梅納反應物 (Maillard reaction product)，並使得蛋白凝結。當表面的溫度升高時，濕度就會相對地降低，因化學及物理變化而使薄層的表面脂肪形成外皮 (crust) (Hallstrom and Skjoldebrand 1983)。隨著溫度從 100 °C 持續增加時，表皮不斷脫水，在加上化學反應，外層會形成多孔的絕緣層一般，使原本在外皮下的水蒸氣往內跑，但因蛋白加熱而破壞結構並皺縮時，水分及肉汁就會往外流出，高熱下形成蒸汽而揮發為油煙，隨著外皮孔徑增大與溫度的上升，更加速水分的流失，油煙也會迅速地增加 (Hallstrom and Skjoldebrand 1983)。此外，烹調時的燃料（如煤炭、煤球、瓦斯）不完全燃燒，會產生多環芳香煙類致癌物 (Wu-Williams *et al.*, 1990)。

### 四、烹調油煙的生物毒性

Berg *et al.*, (1988) 首先報告以不同溫度乾烤瘦豬肉所生成的煙具有致突變性。Teschke *et al.* (1989) 以空氣採樣器收集四個餐廳內的空氣樣品做 Ames test 基因毒性測定，結果發現四個樣品對 TA98 菌株都有直接致突變性，其中兩個樣品對 TA100 菌株也有直接致突變反

應。他們也進一步以GC-MS 分析空氣樣品中的致癌物，結果顯示所分析到的化合物中都沒有已知的致癌物。Qu *et al.* (1992) 報告未精製的菜仔油加熱生成的油煙對TA98 有致突變性，同時也會引起V79 細胞的姊妹染色分體交換頻率增高和血球的微核數增多。他們認為這可能是中國女性罹患肺癌機率較高的原因之一。而本實驗室之前研究更發現油煙萃取物在 SOS chromotest 和 SCE/CHO assay 上都具有基因毒性 (Lee and Yang unpublished data)。因此我們可以肯定炒肉油煙中含有對原核細胞和真核細胞都具有基因毒性的遺傳毒物。但是以上的研究至今都沒有找出油煙中可能引發肺癌的主要致突變物或直接證據。

## 五、烹調油煙的污染物種類

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

#### 1. 來源與分佈

大陸學者 Li, S.G. *et al.* (1994) 報告指出蔬菜油和沙拉油加熱到  $265 \pm 5$  °C 時所生成的油煙中含有高量的 benzo[*a*]pyrene(B[*a*]P) 和 dibenzo[*a,h*]-anthracene (DB[*a,h*]A)，蔬菜油和沙拉油分別含有 B[*a*]P: 0.463 和 0.341  $\mu\text{g/g}$ ，DB[*a,h*]A: 5.736 和 3.725  $\mu\text{g/g}$ ，後者 (DB[*a,h*]A) 的濃度是前者 (B[*a*]P) 的 5.7-22.8 倍。同時他們也分析炸油豆腐店、炸麻花店和炸油條店的空氣樣品中的多環芳香煙，結果顯示亦含有相當高量的 B[*a*]P 和 DB[*a,h*]A，因此他們推測這兩種已知的致癌物可能是



造成廚師和中國婦女罹患肺癌的起始因子。除了烹調油煙之外，PAHs 亦可由許多物質產生。通常是有機物不完全燃燒所致，其來源包括：發電廠石化燃料、焚化爐中廢棄物的高溫燃燒、家庭用的瓦斯加熱器、煤油加熱器、電鍍工廠、鑄造工廠、及熔煉工廠等所排出的污染物 (Hazardous Substances Data Bank, 1988; Lee, *et al.*, 1994 b,d, )。另外，香菸煙霧懸浮微粒，汽機車、運輸貨車、飛機及割草引擎所排放的廢氣 (Venier *et al.*, 1985; Masclet *et al.*, 1986 )，也都是空氣中 PAHs 的主要來源。中國大陸肺癌死亡率最高的雲南、貴州地區，其肺癌死亡率為全大陸平均的五倍 (Mumford *et al.*, 1995 )，被認為與烹調所使用溼煤或木材來燃燒有關，Mumford *et al.* 以 HPLC 分析燃燒煤球的煙霧，發現含有高量的 B[a]A 和 chrysene (Mumford *et al.*, 1987; Chung *et al.*, 1992 )。最近他們又以 GC/MS 分析該地區烹調時，室內空氣中 PAHs 的含量，發現至少有十種超過  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  air，依序為 phenanthrene, FA, pyrene, chrysene, B[a]A, benzoFA, B[ghi]P, 1-methylphenanthrene, B[a]P, anthracene 等，並進一步分析當地居民尿中 PAHs 和 hydroxyPAHs 的含量，發現皆較控制組居民 (昆明居民、華裔美國人) 尿中 PAHs 和 hydroxyPAHs 的含量多，但只有 9-OH-B[a]P 具有統計意義 (ranking test,  $P < 0.05$ ) (Mumford *et al.*, 1995 )。

## 2. 物化性與生成機制

大多數的 PAHs 皆具有較高熔點及沸點，熔點大都高於  $100^\circ\text{C}$ ，在常溫下是以固態存在。以 PAHs 的結構而言，由於只含 C、H

原子，亦無官能基，再加上為環狀結構，因此極性和溶解度皆不高。PAHs 的分子構造為平面狀，又具高度的 electron delocation 特性，絕大多數的PAHs 均帶有很強的螢光放射光譜，可作為螢光偵測辨認。PAHs 中分子量小於230 g/mole 者，屬於半揮發性物質，在一般大氣溫度範圍下，是以氣固相並存於大氣環境中，其氣相單純以蒸氣型態存在，而固相因大氣中之懸浮微粒提供一良好的表面積，所以會吸附在微粒表面上。

PAHs 由於種類眾多（理論上有數千種 PAHs 被合成，但實際上環境中只有數十種之 PAHs 較重要而為學者們研究的對象），故彼此間也有差異性存在。整體而言，PAHs 的反應性不高，本身為原污染源（primary pollutant），在環境中被認為是較穩定的污染物。雖然 PAHs 的反應性不高，但仍會與大氣中其他強反應物作用，如 NO<sub>2</sub>、O<sub>3</sub>、自由基等 作用或被紫外線解離，參與光化學反應，形成二次污染物（second pollutant）。

PAHs 的形成乃是還原狀態下燃燒烴基物質的結果，目前被接受的形成機制為氣相中自由基反應所造成。主要機制有二：

(1) 聚合反應 (pyrosynthesis)：為低分子量有機物經過聚合作用 (polyacetylene) 所造成，因有劇烈放熱反應，故可提供足夠能量來解離端邊分子團 (terminal groups) 和自由價電子 (free valence)，來產生穩定的 PAHs。

(2) 熱解反應 (pyrolysis)：乃高分子有機物經裂解後產生的苯基 (phenyl radical)、丁二烯基 (butadienyl radical) 和苯丁二烯基 (phenyl-butadienyl radical) 反應生成 phenanthrene、benzo[a]pyrene 與 fluoranthene。綜合來說在火焰中形成 PAHs 的機制並非唯一性。在飽

和氣態 ( rich gas ) 火焰中以聚合反應為主。而煤和油滴火焰中，熱解反應則佔優勢。

### 3. 致癌作用的機制

多環芳香煙在生物體內首先會經由微粒體單氧化酵素系統 ( monooxygenase ) 或前列腺素 H 合成酵素 ( prostaglandin H synthase ) 代謝活化成 epoxide ，然後會再水解轉變為 diols 型的活化中間產物，此中間產物可與 DNA 共價結合形成 DNA 鍵結物，造成基因突變而引起癌症發生 ( Dipple *et al.*, 1987) 。現在已知致癌物會在 DNA 上形成 DNA 鍵結物，而可能是引起基因突變，進而引發癌症發生的重要分子機轉。因此環境污染物是否能引起致癌的機制，由標的組織內的 DNA 鍵結物和所引起的主要基因突變，可用來了解環境污染物和癌症的關係。以 B[a]P 為例，B[a]P 有許多代謝路徑，其中主要是經由 cytochrome P450 IA1 酵素系統代謝活化先生成 (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene，然後再繼續氧化形成最終代謝物：anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[ a]pyrene (BPDE)，它會直接攻擊 DNA，因此具有致突變性、致癌性和致腫瘤性。而代謝物主要攻擊 DNA 的 dG 之 N<sup>2</sup> 位置 (Jeffrey *et al.*, 1976, 1977) 。另一個主要代謝路徑是單電子氧化 B[a]P，而產生 radical cation，它就會攻擊 DNA 的 deoxyguanosine 之 N<sup>7</sup> 胺基的位置，而形成 DNA 鍵結物 (Cavalieri and Rogan, 1992) 。而且肺臟中 B[a]P 的代謝速率也比肝臟較為快速。至於 B[a]P 的解毒作用主要是經由 glutathione S-transferase



(GST)，此酵素有許多成員，例如 alpha, mu, theta 以及 pi，而其中在 hamster 細胞內參與 B[a]P 的解毒作用則以 GST pi 為主 (Swedmark *et al.*, 1992)。而此型 GST 會與 B[a]P 的最終代謝物 BPDE 進行結合反應 (conjugation reaction)，而抑制其致突變性和致癌性。在人類細胞株和動物細胞的 GST pi 基因表現就有很大的不同，同時在不同的人類細胞之間可能也有些差異 (Romert *et al.*, 1989; Moscow *et al.*, 1989; Castro *et al.*, 1990; Lee, S. J. *et al.*, 1994)。Miller (1951) 就提出多環芳香煙會鍵結到老鼠皮膚的蛋白分子上。Brookes 和 Lawley (1964) 證明致癌性之代謝活化物會與皮膚的 DNA 形成 DNA 鍵結物。至此以後，PAHs-DNA 鍵結物在人類各器官組織都被偵測到，例如肺臟、支氣管、皮膚、胰臟、口腔黏膜、子宮頸和乳房組織等 (Dunn and Stich, 1986; Phillips *et al.*, 1988, 1990 a, b; Everson *et al.*, 1986; Manchester *et al.*, 1988; Seidman *et al.*, 1988; Schoket *et al.*, 1990)。Harris *et al.* (1991) 發現 B[a]P 會造成 ras 原致癌基因 (protooncogene) 之第 12 密碼 (codon) 發生 G → T transversion。Cherpillod and Amstad (1995) 的研究結果顯示 B[a]P 會造成 p53 抑癌基因之第 248 及 249 密碼發生 G → T transversion。這些結果都證實 B[a]P 確實會引起人類和動物細胞的基因發生突變，甚至可能引起人類癌症。

#### 4. 其他生物毒性

由於多環芳香煙的種類繁多，其基因毒性表現也不盡相同，例如 B[a]A, chrysene, B[a]P, DB[a,h]P, DB[a,h]A 等具有致突變性，且多

數屬於間接致突變物。而有些多環芳香烴則不具有致突變性，例如 phenanthrene, B[e]P, naphthalene 和 fluorene 等 (McCann *et al.*, 1975; Pahlman and Pelkonen, 1987; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992)。但是有些多環芳香烴則隨著 Ames test 上使用的菌種不同，而表現出不同的致突變性，如 anthracene 在 TA98, TA100 和 TA1538 菌種中不具有致突變性，但是在 TA97 則表現出致突變性 (Sakai *et al.*, 1985)。B[a]P 的致突變性和致癌性是多環芳香烴中研究最清楚的，已知除了對沙門氏桿菌會表現致突變性外，對 *E. coli* 也會引起基因毒性。將人類白血球細胞以 100  $\mu$ M B[a]P 處理，在外加酵素活化下，可產生 1.3 adducts /  $10^8$  nucleotides (Roggeband *et al.*, 1993)，同樣地 Gupta *et al.*, (1988) 以 30  $\mu$ g B[a]P 處理，就會生成 2.6 - 48.0 adducts /  $10^8$  nucleotides，其中都具有相同的 BPDE-dG 鍵結物。在實驗動物上，B[a]P 會引起小老鼠的皮膚癌、胃癌、胃腫瘤及白血病 (Culp and Beland, 1994)。Wolterbeek 等 (1993) 以導管直接將 B[a]P 灌入倉鼠的氣管中，結果發現倉鼠氣管會形成 B[a]P 的主要 DNA 鍵結物 dG-(+)-BPDE (Wolterbeek *et al.*, 1993; Roggeband *et al.*, 1994)。以焦煤爐排放物處理老鼠 24 小時，會在肺臟及心臟測到 B[a]P 的鍵結物，含量分別為 16.3 及 12.9 adducts /  $10^9$  nucleotides (Hughes *et al.*, 1993)。此外，牛皮癬病患每天以含有 10 mg B[a]P 的瀝青治療，在其白血球中，可測到 7.7 adducts /  $10^8$  nucleotides。van Schooten 等 (1990) 發現在肺癌病患的正常肺組織中含有 dG-BPDE-DNA 鍵結物。除了 B[a]P 外，有些多環芳香烴具有很強的致癌性如 DB[a,h]A 和 DB[a,h]P (Richard *et al.*, 1990)。B[g,h,i]P 會與 DNA 形成多種 DNA 鍵結物，而且在體內和體外實驗中 B[g,h,i]P 存於多種多環芳香烴的混合物中也會造成 DNA 鍵結物的形成，因此

B[g,h,i]P 可被認為是一種基因毒物，其致癌性值得再深入研究 (Hughes and Phillips., 1993)。Hughes *et al.*, (1993) 以煤焦油 (coal tar) 處理雄性 Parkes 種小白鼠後，發現可引起小白鼠的腫瘤發生，同時與處理人工合成且已知含量之多環芳香煙所形成的鍵結物作一比較，也發現了體內產生 B[g,h,i]P、B[a]P、B[b]FA、B[k]FA、B[j]FA 等的 DNA 鍵結物。為了更證實多環芳香煙的致癌性，將多環芳香煙塗抹在老鼠的皮膚上，以觀察動物是否會發生腫瘤，結果顯示有些多環芳香煙，例如 B[a]A, B[a]P 和 DB[a,h]A 都會引起動物的皮膚上長出腫瘤。最近也發現 dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P) 是一種很強的致癌物，在 1~0.25  $\mu\text{mol/gland}$  濃度，就會誘發小老鼠皮膚及乳腺發生腫瘤，較 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene (DMBA) 及 B[a]P 的致癌性還要強 (Higginbotham *et al.*, 1993)。

## (二) 硝基多環芳香煙 (Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitro-PAHs)

### 1. 來源與分佈

硝基多環芳香煙是由多環芳香煙經過硝化作用 (nitration) 加上一個或多個硝基取代基而生成的，現已知的硝化機轉有二：(一) 在大氣條件下，當  $\text{NO}_2$  或  $\text{N}_2\text{O}_5$  存在時多環芳香煙會經由光化學反應與氫氧自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 反應 (Zielinska *et al.*, 1990) (二) 在燃燒過程形成  $\text{NO}_2^+$  (nitrinium) 會與親電子性的多環芳香煙發生硝化作用而形成

。硝基多環芳香烴的分佈非常廣，包括有抽菸、都市空氣之懸浮微粒、柴油車、汽機車、飛機等排放的廢氣 ( Beland *et al.*, 1985; Tokiwa *et al.*, 1986; Robbat *et al.*, 1986; Lewtas *et al.*, 1990 )，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、煤炭的灰燼、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。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.*, 1994b, d)，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.*, 1995)。

## 2. 代謝活化

大部份的硝基多環芳香烴對細菌和哺乳動物細胞都具有致突變性，其致突變性可能是藉由硝基取代基的還原作用或環氧化作用後，形成的活化代謝物鍵結上DNA而造成 ( Chou *et al.*, 1985; Delcolos *et al.*, 1988)。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 ) 。

### 3. 生物毒性

1950 年首先報告硝基多環芳香烴會誘發腫瘤形成。目前已知許多硝基多環芳香烴對細菌具有致突變性 (Beland *et al.*, 1985) , 如沙門氏桿菌 TA98, YG1024 菌種。對哺乳類細胞 V79, CHO, HepG2, CHL, HSBP, MCL-5 cells 具有致突變性及基因毒性 (Roscher *et al.*, 1992; Wiebel *et al.*, 1992; Edgar *et al.* 1985; Silvers *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1991; Busby *et al.*, 1994) 。在動物實驗上, 以 1,6-DNP 為例, 發現具有致癌性。若將 6.3  $\mu\text{mol}$  (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  $\mu\text{mol}$  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 Syrian 黃金倉鼠發生上皮性肺癌 (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 $\mu$ g 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) 異環胺類 (Heterocyclic amines, HAs)

#### 1. 來源與分佈

在 1980 年 Kasai 等首先發現以一般烹調方式燒烤沙丁魚會產生

2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)，後來許多學者也在其它食物中發現 IQ。例如罐頭中濃縮牛肉汁 (Aeschbacher *et al.*, 1989)、煙燻乾鰹魚 (Kikugawa *et al.*, 1986)、煎蛋 (Grose *et al.*, 1986)、豬肉汁 (Lee *et al.*, 1994f) 等。除此之外，從烹調食物的煙霧懸浮微粒萃取物中也偵測到 IQ 的存在 (Wakabayashi *et al.*, 1992)。許多研究陸續偵測出在經過烹調的肉類及魚類食品中，例如炸牛排、豬排、炭燒牛排、炸雞腿、烤鱈魚、煎魚等，都被證實含有各種不同的異環胺類致突變物 (Felton and Knize, 1994)。本研究室 Lee 和 Tsai (1991a) 在台灣普遍食用的紅燒鰻罐頭中發現有 MeIQx 與 7,8-DiMeIQx。同時也發現長時間煮沸豬肉汁中，含有 IQ, MeIQ 與 MeIQx (Lee *et al.*, 1994f)。Jagerstad *et al.*, (1983, 1991) 指出有許多異環胺類 (Heterocyclic amines, HAs) 的化合物，是由梅納反應而形成其中 IQ 可能是經由 pyrazines 或 pyridines 等典型的梅納反應物和醛類進行結合反應 (Conjugation) 而形成的。pyridine 和 pyrazine 是由醣類與胺基酸經過 Strecker 裂解而形成的 Amadori 類化合物，而醛類亦可能是胺基酸經 Strecker 裂解反應而形成，至於 IQ 化合物 imidazole 的部份則可能是由肌酸轉化成肌酸酐而來的。Tsuda 等人 (1985) 依照異環胺類化合物對亞硝化反應後其致突變性變化的情形，將其區分為兩大類，第一類為非 IQ 型化合物，其環外胺基可被亞硝酸化反應為羥基而降低其致突變性。例如色胺酸熱解產物 3-amino-1-methyl-5-*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2)，麩胺酸熱解產物 2-amino-dipyrido [1,2-*a*: 3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-2)，苯丙胺酸熱解產物 2-amino-5-phenylpyridine (Phe-P-1) 及大豆球蛋白的熱解產物 2-amino-9-*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (A  $\alpha$  C)。第二類為 IQ 型化合物，其環外胺基不會因亞硝酸化而失去致突變性，例如 IQ, 2-

amino-3, 4-dimethyl-imidazo[4,5-*f*]quinoline (MeIQ), 2-amino-3, 7, 8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (7,8-DiMeIQx), 以及 Nukaya 等 (1994) 在牛肉萃取物中發現一個新致突變物 2-amino-1, 7, 9,-trimethylimidazo[4,5-*g*]quinoxaline (7,9-DiMeIgQx)。上述這兩類異環胺類均具致突變性，其中 IQ 是 IQ 型異環胺類最具致癌性之化合物 (Layton *et al.*, 1995)。

## 2. 代謝活化

IQ 的代謝就是主要經由內質網上的細胞色素 P-450 (Cytochrome P-450) 加氧酵素系統進行羥基化，而生成具有致突變性的代謝活化物 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (N-OH-IQ) (Kato, 1986; Yamazoe *et al.*, 1989; Shimada *et al.*, 1989)。Yamazoe *et al.*, (1983) 首先發現以 Aroclor 1254 誘發的大白鼠肝臟微粒體酵素，會活化 IQ 成爲 N-OH-IQ，這個代謝物已被證實會直接攻擊 DNA 而形成 IQ-DNA 鍵結物 (Takamura *et al.*, 1981; Snyderwine *et al.*, 1988)。另有學者利用 DNA 重組技術將各種 Cytochrome P-450 的基因植入細胞，來研究這些基因是否參與 IQ 的代謝活化，結果證實細胞色素 P-450 1A2 爲代謝活化 IQ 的主要酵素系統 (Aoyama *et al.*, 1989)。後來又發現 P-450 1A1 也會參與 IQ 的代謝活化作用，但是其活化能力只有 P-450 1A2 的二十五分之一 (McManus *et al.*, 1989)。膀胱含有 Prostaglandin H synthase (PHS) 酵素，是一種花生油酸依賴性過氧化酵素 (Arachidonic acid-dependent peroxidase)，會將 IQ 過氧化 (Wild and

Degen, 1987)，而所生成的代謝物能與蛋白質及DNA鍵結(Nemoto and Takayama, 1984)。除了膀胱之外，人類的大腸、攝護腺及肺臟亦發現含有此種酵素(Flammang *et al.*, 1989)。此外，IQ也如同其他異環胺類化合物可以在細胞質層中直接被N, O-乙醯基轉移酵素(N, O-acetyltransferase)進行N-乙醯化作用(N-acetylation)形成N-acetyl-IQ，而較不具有致突變性(Brunborg *et al.*, 1988)。細菌內的O-acetyltransferase可進一步酯化N-OH-IQ成爲2-acetoxyamino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline(N-acetoxy-IQ)。在大白鼠及人類組織之細胞質層中含有乙醯基CoA依賴性N, O-乙醯基轉移酵素(acetyl CoA-dependent N, O-acetyltransferase)，也可進一步代謝N-OH-IQ形成N-acetoxy-IQ(Flammang *et al.*, 1988; Yamazoe *et al.*, 1989)而質子化爲親電性物質(Electrophilic species)，更容易和DNA反應形成鍵結物(Snyderwine *et al.*, 1988)。此外也有PAPS-dependent sulfotransferase會將N-OH-IQ活化成爲2-sulfonylamino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline(IQ-N-sulfate)，可以表現出更強的致突變性。

### 3. 生物毒性

由Ames test發現IQ是一種引起結構移位突變的間接致突變物(Indirect frameshift mutagen)。IQ類化合物在已植入*lacZ*基因的*E. coli*中所引起之致突變性表現，也都是造成結構移位突變(Watanabe and Ohta, 1993)。除了對原核生物具有基因毒性之外，IQ也會誘發真核細胞產生基因突變，但其表現的基因毒性能力就比在Ames test中弱

的多。Endo *et al.*, (1994) 以 shuttle vector 的方法分析 *supF* tRNA 基因上 IQ 的突變特異性，發現會引起 G : C → T : A 的轉換突變 (transversion mutation)，其次造成 G : C → A : T 和 G : C → C : G 鹼基更換突變 (base substitution mutation)。本研究室 Lee 和 Shin (1995) 分析 IQ 在 CHO-K1 細胞之次黃嘌呤鳥糞嘌呤轉磷酸核糖基酵素 (HPRTase) 基因上造成的突變特異性，則發現除了發生缺失突變 (deletion mutation) 外，也造成鳥糞嘌呤—胞嘧啶鹼基對 (GC base pair) 上的 G → A 和 G → C 鹼基更換突變。Tachino *et al.*, (1995) 也指出 IQ 能誘發大白鼠 *ras* 基因之突變，主要是造成其 *ras* 基因之 codon 12 和 13 發生 GGT → GAT 和 GGC → GCC 突變，而引發腫瘤的形成。在動物體內實驗中，IQ 能誘發實驗動物產生各種器官組織發生腫瘤。例如 IQ 會誘發大白鼠之肝臟、腸道、淋巴腺 (zymbal gland)、陰蒂腺 (clitoral gland)、耳道、乳腺及皮膚產生腫瘤 (Makino *et al.*, 1992)，同樣也會引起小白鼠的肝臟、胃、肺臟形成腫瘤 (Tanaka *et al.*, 1985; Sugimura *et al.*, 1988; Esumi *et al.*, 1989; Sugimura *et al.*, 1990)。Adamson *et al.*, (1990) 又發現 IQ 可誘發高等哺乳類猴子之肝臟細胞形成惡性腫瘤。由此可知，IQ 雖然是一種很強的細菌致突變物，但是對哺乳類細胞而言卻是一種弱基因毒物，然而對於實驗動物而言，卻又是一種能引起多種器官組織發生腫瘤的廣泛性致癌物 (pan-carcinogen)。最近幾年，發現在烹調魚肉和其他肉類過程中有好幾種的 HCAs 和其裂解產物產生，不僅對 *S. typhimurium*. 有很強之致突變性 (Sugimura and Sato 1983; Wakabayashi, *et al.*, 1992; Felton and Knize, 1991)，對嚙齒科動物亦有致癌性 (Wakabayashi, *et al.*, 1992)。PhIP 會使母鼠 (F344) 發生乳腺癌而使公鼠 (F344) 罹患直腸癌 (Ito, *et al.*,

1991) , 在其他品種 (Sprague Dawley) 的老鼠實驗亦被證實會使 PhIP 引發乳腺癌 (Ghoshal, *et al.*, 1994) 和直腸癌且有量的正向關係 (Hasegawa, *etal* 1993) 。 1997 年 Shirai 等學者發現 PhIP 也會引起前列腺癌達 66.67 % (n=27) ( Shirai *et al.*, 1997 ) 。

## 參、研究動機

台灣地區男性有 60 % 為抽菸者，而女性僅佔 3% ，可是男性肺癌的發生率僅較女性高出一倍（中華民國台灣地區公共衛生，衛生署，1993）。造成這個結果的可能原因有：(1) 女性有重要且非香菸之環境污染源，(2) 女性對環境污染物之敏感性較男性強，(3) 女性特殊的生理狀態造成其對環境污物所引起之內生性 DNA 傷害較男性強。顯然除了抽菸以外，台灣女性有另外重要的致癌因子。Gao *et al.* (1987) 提出中國女性抽菸比例很低僅有 11.8% ，但是罹患肺癌的比率竟高達 19.3% ，且大部分是屬於肺腺癌 (adenocarcinoma) ，在美國的華人女性罹患的肺癌也大多為腺腫瘤 (39.3%) ，其他非華人的肺癌屬於這類的腺腫瘤罹患機率僅有 17.4% (Green and Brophy, 1982) ，而此類型癌症和抽煙較無關係 (Gao *et al.*, 1986) 。雖然抽菸是肺癌發生的重要因子 (Zanidze and Peto, 1986) ，但在流行病學調查研究上發現，除了香菸以外中國女性肺癌有更重要的致癌因子 (Koo and Ho 1990) 。許多學者也在肺癌病患的肺組織中分析到 PAH-DNA adducts (Schooten *et al.*, 1990; Weton and Bowman, 1991) 。本實驗室之前的研究也發現六十五位台灣地區肺癌病患經外科手術所獲取的肺組織中 PAHs-DNA 鍵結物之含量女性肺癌病患並不低於男性，結果顯示其 PAH-DNA adducts 較國外的報告的數值為高，且推測女性肺癌病患中 PAHs-DNA 鍵結物的來源可能有特殊環境污染物或是女性對環境污染物的敏感性較高 (Lee and Chen unpublished data 1996) 。

Liu, Q. *et al.*, (1993) 以中國廣州 316 個肺癌病人作為研究對象，

發現除了香菸以外，廚房污染源亦為肺癌之發生因子，尤其是長期接觸烹調油煙的女性。流行病學調查顯示烹調所產生的油煙會引起鼻咽癌、口腔癌、膀胱癌和肺癌 (Cole *et al.*, 1972; Hederson *et al.*, 1978; Dickson, 1981; Hargraves and Pariza, 1984)。新加坡學者發現華人廚師罹患肺癌的機率較高 (Law *et al.*, 1976)。Dubrow *et al.* (1984) 和 Coggon *et al.* (1986) 報告廚師罹患呼吸道癌症的機率較其他癌症的機會高。這些結果都顯示烹調生成的油煙中可能有致突變物或致癌物，而引起呼吸道癌症。因此推測中國女性肺癌之發生可能與烹調以及性荷爾蒙有很大的關係。廚房的室內空氣污染源已知至少有三類，一類與烹調時用的爐具燃料有關，例如煤炭、煤球、瓦斯不完全燃燒會產生多環芳香羥類致癌物 (Wu-Williams *et al.*, 1990)。另一類為烹調時產生的油煙，Teschke *et al.* (1989) 以空氣採樣器收集四個餐廳內的空氣樣品做 Ames test 基因毒性測定，結果發現四個樣品對 TA98 菌株都有直接致突變性，其中兩個樣品對 TA100 菌株也有直接致突變反應。本實驗之前的研究也發現油煙萃取物在 SOS chromotest 和 SCE /CHO assay 上都具有基因毒性。因此炒肉油煙中含有對原核細胞和真核細胞都具有基因毒性的遺傳毒物。Qu *et al.* (1992) 報告未精製的菜仔油加熱生成的油煙對 TA98 有致突變性，同時也會引起 V79 細胞的姊妹染色分體交換頻率增高和紅血球的微核數增多。他們沒有分析造成基因毒性的化學成分。Li, S.G. *et al.* (1994) 報告蔬菜油和沙拉油加熱到  $265 \pm 5^{\circ}\text{C}$  時所生成的油煙中含有高量的 benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) 和 dibenzo[*a,h*]anthracene (DB[*a,h*]A)，蔬菜油和沙拉油分別含有 B[*a*]P: 0.463 和 0.341  $\mu\text{g/g}$ ，DB[*a,h*]A: 5.736 和 3.725  $\mu\text{g/g}$ ，後者的濃度是前者的 5.7-



22.8 倍。同時他們也分析炸油豆腐店、炸麻花店和炸油條店之空氣樣品中的多環芳香羣，結果顯示亦含有相當高量的B[a]P和DB[a,h]A，因此他們認為這兩種已知的致癌物可能是造成廚師和中國婦女罹患肺癌的起始因子。但究竟油煙中哪些才是主要的肺癌致癌成份，一直沒有直接證據發現。烹調所產生的油煙對中國女性肺癌之發生可能扮演重要的角色，除了注意油煙本身所引起的鍵結物之外，還需要了解油煙是否會誘發女性內生性的傷害。最近學者漸漸重視生物體內自行發生的脂質過氧化作用，而生成的 $\cdot O_2^-$ 或 $\cdot OH$ 等游離基對DNA的傷害，會生成氧化性的鹼基，例如8-hydroxy deoxyguanosine (8-OH dG)此化合物已被作為DNA傷害之指標物。或產生脂質過氧化終產物malondialdehyde (MDA)而與deoxynucleotides形成MDA-DNA鍵結物，它會引起G → T突變。所生成的MDA-DNA鍵結物與8-OH dG的含量是有相關的(Chaudhary *et al.*, 1994)。同時，已知多環芳香煙類化合物在金屬離子存在下會生成 $\cdot O_2^-$ (Sullivan, 1985; Lilienblum *et al.*, 1985)，會引起脂質過氧化作用而產生MDA進而增加內生性DNA的傷害。Hart *et al.*, (1993)更發現當肺癌發生時， $Cu^{2+}$ 有堆積到肺組織中的現象，如此是否會在肺的高氧狀態下，促進脂質過氧化作用的速率，產生更多的MDA DNA鍵結物造成DNA傷害。因此找出油煙中的主要致突變物及其對細胞所造成的DNA傷害外？還需注意到生物體之內生性的DNA傷害。對女性肺癌的研究，為當務之急的課題。

## 肆、材料與方法

### 一、材料與化學藥品

白鯧魚四條 (購自台中大買家) 。豬肉 (台中民間市場) F12 medium, BME medium, fetal bovin serum (FBS ), penicillin, streptomycin, trypsin, non-essential amino acid (NEAA ), 由美國 Gibco BRL 公司購得。細胞培養皿由丹麥 Nunc 公司購得。Aroclor 1254 由美國 Chem Service 公司購得。dinitropyrene isomers (DNPs ), 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP), catalase, potato apyrase ( PA ), bicine solution, ammonium formate, L-glutamine, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( NADP ), 17 $\beta$ -estradiol, bovine serum albumin (BSA), glucose-6-phosphate ( G-6-P ), micrococcal endonuclease ( MN), dithiothreitol ( DTT ), xanthine oxidase, 1,1,3,4-tetra-ethoxypropane ( TEP ),  $\beta$ -mercaptoethanol, potato apyrase, chrysene, pyrene, benzo[ *a*]pyrene, dibenz[ *a,h*]anthracene, 8-OH dG, butylated hydroxy-toluene ( BHT ), thiobarbituric acid ( TBA ), trichloroacetic acid ( TCA ) 由美國 Sigma 化學藥品公司購得。[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP, [methyl-<sup>3</sup>H]dTTP 由英國 Amersham International Plc. 購得。xanthine 由英國 Lancaster 公司購得。T4 polynucleotide kinase 由美國 New-England Bio-Labs 公司購得。phenol 由美國 Amresco 公司購得。EDTA, 4-dNTPs, proteinase K, calf thymus DNA, spleen phosphodiesterase ( SPD ), tris[hydroxymethyl]-aminomethane ( Tris ), Tris-hydrochloride ( Tris-HCl ), nuclease P1 由德國 Boehringer-Mannheim 公司購得。PEI-cellulose TLC plate 由德國 Macherey-Nagel 公司購得。十六種多環芳香煙標準品則由美國 Supelco 公

司購得。fluoranthene, benzo[*b*]-fluoranthene, anthracene, benzo[*g,h,i*]perylene 由美國 Aldrich 化學藥品公司購得。benz[*a*]anthracene, 1-nitro-naphthol 購自日本東京化成工業株式會社。formic acid, isoamyl alcohol, sodium acetate, ammonium sulfate 由 Riedel-de Haen 公司購得。sodium sulfate anhydrous, sodium hydrogen sulfide monohydrate, tetrabutylammonium chloride (TBAC) 由瑞士 Fluka 化學藥廠購得。p53 antibody, DAB, antibody diluent, link antibody, streptavidin-horseradish peroxidase 由丹麥 DAKO 公司購得。ammonium solution, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由日本 Wako 公司購得。X-ray film 由美國 Kodak 公司購得。其他藥品，則購自德國 E. Merck 化學藥品公司，而有機溶劑購自台灣皓峰公司。

## 二、煎魚和炒豬肉油煙的製備與基因毒物之萃取

取四條白鯧魚共重 1042 克，每次以 15 ml 沙拉油煎一條魚，豬肉共約 3500 克，每次以 10 ml 沙拉油炒 200 克，其所生成之油煙先用排油煙機過濾油脂，然後在排氣口處裝設空氣採樣器採得樣品，同時詳細記錄調理時的溫度和時間 (Table 1)，烹調方式儘量和一般家庭相似。而採樣過的玻璃纖維濾紙剪成一公分見方的小塊泡在 200 ml 丙酮中，以振盪器振盪一小時，然後再以 Whatman No. 1 濾紙過濾得丙酮萃取液，以上述方法重覆三次，將所有的丙酮萃取液集中起來，再加入無水硫酸鈉脫水、過濾，此萃取液再經減壓濃縮，其殘留物為煎魚油煙懸浮微粒丙酮萃取物，溶於一定量之有機溶劑中，以此為樣品做致突變性的測試與鑑定，流程如 Fig. 1. 所示。

### 三、樣品之純化

#### 1. Baker-10 管柱純化 PAHs

煎魚和炒豬肉所得之油煙粗萃取物以 BAKER-10 SPE ( Solid Phase Extraction ) system 純化，所使用的管柱為 octadecyl(C 18) 管柱。將 10 mg 油煙之丙酮萃取物以氮氣吹乾，先溶於 3.5 ml isopropanol 再溶入 20ml H<sub>2</sub>O 以備通入管柱用。購得之 Baker-10 管柱先以 6 ml methanol 濕潤後，再以 9 ml isopropanol/H<sub>2</sub>O ( 15/85, v/v ) 將管柱活化，並使溶劑保持在管柱固相物的上方，然後注入樣品直至所有溶液通過管柱，然後再以幫浦抽五分鐘，直至管柱完全乾為止。接著以 6 ml 甲醇沖提出結合在管柱上的物質，此沖提液以氮氣吹乾後，溶於 1 ml 甲醇中儲存於 -20°C 冰箱中備用，此萃取物即稱為油煙粗萃取物之 Baker-10 多環芳香烴純化物 (FOSC-B 或 POSC-B)。將所得到的 methanol 沖提物保存於 -20°C 冰箱中，以備做化學物之分析和致突變性之測定。

#### 2. 半製備型 HPLC 與分析級 HPLC 純化分析 Nitro-PAHs

煎魚所得之油煙萃取物先以半製備型高效層析儀管柱 Spherisorb S10 ODS2 column，沖提液為 methanol-MCIlvaine's buffer ( 80:20, v/v, pH 5.0 )，流速為 2.5 ml/min。以 UV detector 289 nm 偵測之。純化所得之每分鐘收集起來，以 TA98 測定其致突變性，以得知其主要致突變區

分，然後在將此具有致突變性的初步純化物，以分析級之高效液態層析儀管柱再純化，即 Merck 50983 RP-18 column，沖提液為 methanol-MCIIvaine's buffer (65:35, v/v, pH 5.0)，流速為 1.0 ml/min。以 UV detector 289 nm 偵測之。其每分鐘的流出液收集起來，以 Ames test 分析其致突變性，所得之純化物做 LC-MS (VG plate form II) 的分析，以確定其質量，其移動相為 methanol/water = 50/50, 0.5% ammonia，流速為 0.1 ml/min。

#### 四、肝臟微粒體酵素 (S9 fraction) 之製備

肝臟微粒體酵素 (S9 fraction) 製備之方法如 Maron and Ames (1983) 所述。選取體重約 180-200 公克之 Sprague Dawley 雄鼠，將溶於玉米油之 Aroclor 1254，劑量為 500  $\mu$ g/kg/2.5 ml 注射入腹腔以誘發其酵素活性，五天後以斷頭方式犧牲老鼠。在此期間無限制供應飲水和飼料，直到犧牲老鼠前 24 小時，才將飼料移開。在無菌狀態下將肝臟取出，利用 0.154 M KCl 緩衝溶液清洗肝臟數次，以除去血紅素，避免抑制 cytochrome P450 酵素的活性。然後加入三倍體積的緩衝溶液，以均質機將肝臟組織磨碎，經 9000 g, 4°C 離心 10 分鐘後，所得之上層液即為 S9。

#### 五、致突變性之測定

樣品之致突變性測定是依照 Maron and Ames (1983) 的標準平板混合測試法 (plate incorporation test) 進行。其主要步驟如下所述：首先將不同濃度之樣品 (溶於 0.1 ml DMSO) 加到含有 2 ml top agar 之試管中，再加入 0.1 ml 隔夜培養之 TA98 或 TA100 菌液，然後加入或不加入 0.5 ml 4% S9 混合液，以試管振盪器 (Vortex mixer) 混合均勻後，迅速倒入含 bottom agar 之培養皿上搖勻，待 top agar 凝固後，立即將培養皿移入 37°C 的恆溫箱中。經 48 小時培育後取出，以菌落計數器計數反突變菌落數。每次實驗均包括負控制組和以 1-nitropyrene (1-NP) 和 benzo[a]pyrene (B[a]P) 做為標準致突變物之正控制組。所有數據都是以三次重覆 (triplicate) 所計算的平均值 ± 標準差表示。

## 六、PAHs 之 HPLC 分析

經過 Baker-10 C18 column 純化之有致突變活性之樣品 (FOSC-B, POSC-B)，經過濾膜 (0.2  $\mu\text{m}$ , Gelman, USA) 過濾後，直接注射入高效能液態層析儀 (HPLC) (model D-6000, Hitachi, Tokyo, Japan)，其分析條件為：使用 Spherisorb S5 PAH column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm i.d. x 150 mm)，沖提液以 isocratic 方式沖提，移動相為 acetonitrile : water (85 : 15, v/v)，流速為 1.5 ml/min，螢光偵測器波長為 excitation 306 nm，emmission 398 nm，分析時間共 30 分鐘。利用 PAHs 標準品所得的標準曲線，計算出樣品中十種多環芳香煙之含量。

## 七、PAHs 之 GC 定性分析

經過 Baker-10 管柱純化之油煙萃取物之多環芳香烴純化物 (FOSC-B, POSC-B)，以氣相層析儀分析其中的多環芳香烴成份，其分析步驟主要依照 Strandell 等人(1994) 的方法。本實驗以 Varian GC (Star 3400) 氣相層析儀，分析條件為：J &W DB-5 毛細管柱 (capillary column, 0.32 mm i.d. x 30 m)、偵測器為 flame ionization detector、carrier gas 為氦氣(He)、流速為 1.8ml/min、管柱溫度初始溫度 180°C 維持 2 分鐘後，以每分鐘 5°C 上升至 260°C 維持 1 分鐘，再以每分鐘 0.5°C 上升至 265°C 維持 1 分鐘，最後以每分鐘 3°C 上升至 310°C 維持 10 分鐘、偵測器溫度為 330°C、注射器為 320°C。

## 八、臺灣肺腺癌 CL-3 細胞之培養

臺灣肺腺癌 CL-3 細胞是台大醫院楊泮池醫師殖株培養成功之人類肺癌細胞株，而本研究所欲使用之 CL-3 即由楊醫師處獲得。以含有 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)，0.03% penicillin/streptomycin (100 U/ml), 5.5 % bicarbonate 之 F-12 medium (Gibco) 培養於 100% 溼度, 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C incubator 中，CL-3 細胞在形態學上屬於 epithelial-like cell。另外，在 nick translation assay 實驗中所選用的細胞株為 WI-38 細胞，其以 BME 培養液培養之，WI-38 細胞為正常之女性肺細胞株，購自美國 American Type Culture Collection (ATCC) 公司，在形態學上屬於 fibroblast-like cell。

## 九、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% CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^6$  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。

## 十、DNA 的萃取與純化

經過 24 小時處理的人類肺腺癌 CL-3 細胞以 standard phenol (Maniatis *et al.*, 1982) 方法萃取 DNA。首先將細胞自培養皿收下來後置於 1.5 ml eppendorf 管內，加入 500  $\mu$ l 含有 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS 和 10 mM Tris 的 digestion buffer，以及 5  $\mu$ l proteinase K ( 10 mg/ml ) 在 56°C 培育數小時。以等體積 phenol : chloroform : isoamyl alcohol ( 25 : 24 : 1, v/v/v ) 混合液萃取，經混和均勻後，以 12,000 rpm 的速度離心 10 分鐘，取上清液後，再重覆做同樣動作二次，以完全去除蛋白。再加入等體積 chloroform : isoamyl alcohol ( 24 : 1, v/v ) 混合液萃



取，經混和均勻 5 分鐘後，以 12,000 rpm 的速度離心 5 分鐘，以去除 phenol。取上清液加入 1/10 體積的 3 M sodium acetate 及 2 倍體積 100% coldethanol 混和均勻，靜置於 -20°C 的冰箱中 2 小時。以 12,000 rpm 的速度離心 10 分鐘，收集 DNA 沈澱物，再以 70% coldethanol 洗去殘留的鹽類兩次，離心留下 DNA 沈澱物，最後 DNA 以 Speed Vac 濃縮機 (Savant Instrument, Inc., Hickville, NY) 濃縮至乾，以滅菌水於 40°C 溶解。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 處理以水解多餘的 RNA。DNA 的濃度以下列的公式計算： $\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數} / 1000$ 。

十一、以  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 方法分析 DNA 鏈結物 (Gupta *et al.*, 1982; 1985; Roy *et al.*, 1989; Reddy *et al.* 1990; Geneste *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994e)

### (一) PAHs-DNA 鏈結物之分析

#### 1. In vitro PAH-DNA 鏈結物之合成

將 4% S9 mix、小牛胸腺 DNA，分別加入各種 PAH 50  $\mu\text{M}$ ，混合均勻後，於 37°C 水浴中培育 3 小時，反應終止後以進行 DNA 萃取與定量 (如上述)。

## 2. 煎魚油煙萃取物處理小牛胸腺 DNA

同上，將 4% S9 mix、小牛胸腺 DNA，加入各種油煙萃取物，混合均勻後，於 37°C 水浴中培育 3 小時，反應終止後以進行 DNA 萃取與定量（如上述）。

## 3. 煎魚油煙萃取物處理 CL-3 細胞

在 10 cm 培養皿中種入  $1 \times 10^6$  的 CL3 細胞，將溶於 50  $\mu$ l DMSO 的油煙萃取物加入培養皿中，經過 24 小時後將細胞刮下，加入 20  $\mu$ l 10% SDS, 4  $\mu$ l proteinase K ( 1 mg/ml ) 和 376  $\mu$ l digestion buffer，於 56°C 下反應 18 小時後萃取 DNA，步驟如上所述。

## 4. DNA 鍵結物之分析

上述萃取、純化出來的 DNA 利用  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 方法以 PAH-DNA 鍵結物之移動相分析 aromatic/hydrophobic DNA 鍵結物。本實驗步驟主要依據 Reddy *et al.* (1990) 的方法進行。首先取 2  $\mu$ g DNA 加入至含有 0.75 unit micrococcal endonuclease (MN) 和 7.75  $\mu$ g spleen phosphodiesterase (SPD) 之 succinate buffer 中，於 37°C 水浴中培育 4 小時，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3'-monophosphate。以 nuclease

P1(NP1) 方式進行 DNA adduct enrichment，則加入 6  $\mu\text{g}$  NP1, sodium acetate 以及  $\text{ZnSO}_4$  於  $37^\circ\text{C}$  水浴中培育 1 小時。然後加入含有 5 units 之 T4 polynucleotide kinase 和  $1\ \mu\text{l}$  之  $10\ \mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP 的混合液，於  $37^\circ\text{C}$  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 鍵結物反應液點在 PEI-cellulose TLC plate 上，利用三種移動相，三個方向展開，每次展開後 TLC plate 都要經過剪除濾紙、洗片和晾乾的步驟。三種移動相分別為：D1-2.4 M sodium phosphate (pH 6.0); D3-3.6 M lithium formate, 8.5 M urea (pH 3.5); D4- 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris base, 8.0 M urea (pH 8.0)。展開後的 TLC 片先以 counter 測定其放射性強度後放入 X 光片夾中，以 TLC 片子上的放射性強度決定置於  $-80^\circ\text{C}$  冰櫃中穩定顯影的時間，曝光後，X 光片上會顯出 DNA 鍵結物之位置。另外，稀釋 DNA 水解溶液並以 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP 標記所有核甘酸 (total nucleotides)，然後利用 40 mM ammonium sulfate (pH 5.27) 展開，確定所有核甘酸之位置。定量時則依照 X 光底片上的相對位置，將 PEI plate 上的 DNA 鍵結物與所有核甘酸剪下，置於 Mini poly-Q vial 內，再加入閃爍計數液，以 Beckman L-6500 Scintillation Counter 測定其放射性強度。以下列公式計算 DNA 鍵結物之相對含量：

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

## (二) Nitro-PAHs-DNA 鍵結物之分析

### 1. in vitro dinitropyrene-DNA 鍵結物標準品之合成

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  $\mu$ l 的 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶解之，然後加入 10  $\mu$ l hypoxanthine (50 mg/ml)、10  $\mu$ l catalase (1 mg/ml) 和 25  $\mu$ 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 並定量 (方法如上述)。

## 2. 煎魚油煙萃取物處理小牛胸腺 DNA

分別將 FOSC 以及經半製備純化的油煙濃縮液處理小牛胸腺 DNA，利用 DNP-DNA 鍵結物合成的方法進行處理 (參考上述)。

## 3. 煎魚油煙萃取物處理 CL-3 細胞

步驟如上所述。

## 4. DNA 鍵結物之分析

首先 10  $\mu$ g DNA 加入至含有 1.5 units MN 和 15.5  $\mu$ g SPD 之

succinate buffer 中，於 37°C 水浴中培育 4 小時，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3'- monophosphate。加入 10 mM tetrabutylammonium chloride (TBAC) 和 100 mM ammonium formate (pH 3.5)，用 1-butanol 萃取 DNA 鍵結物以增強鍵結物的含量；以等體積的 1-butanol 萃取兩次，收集上層液(1-butanol 層)，接著以 Speed Vac 減壓濃縮後，溶於 18  $\mu$ l 的無菌水中，然後進行 postlabeling 的步驟，最後將此放射性標記過的 DNA 鍵結物反應液點在 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 base, 8.0 M urea (pH 8.0); D5- 0.9 M sodium phosphate (pH 6.8)。顯影與定量的步驟同上所述。

### (三) malondialdehyde(MDA)-DNA 鍵結物之 $^{32}$ P-postlabeling 分析 (Vaca *et al.*, 1992)

#### 1. MDA-DNA 鍵結物之合成

參考 Vaca *et al.*, (1992) 的方法進行 MDA-DNA 鍵結物標準品的合成。將 2.2 g (0.01 mol) 1,1,3,3,-tetraethoxypropane(TEP)(95%) 溶於 100 ml 0.1 M HCl(0.1 M TEP) 中 pH 值為 4.5，在 40°C 水浴中培育 40 分鐘後，分別與 guanosine, adenosine, cytidine 以及小牛胸腺 DNA 2.5 mmol 並加入 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.1 mol; 13.6 g in 1000 ml)，總體積為 1000 ml，在 37°C 水浴中培育 10 天後，在 40°C 中濃縮至 100 ml，加入 600 ml acetonitrile 並靜

置於4°C 冰箱中 overnight，將沈澱物過濾掉並以 95% acetonitrile 沖洗之，然後濃縮至 50 ml 並靜置於 4°C 冰箱中 overnight，過濾後以 polyamide 50 mm × 30 cm 管柱（沖提液：水）純化，將沖提液收集並濃縮至 50 ml 後以 RP18 10 mm × 250 mm 管柱（沖提液：5% acetonitrile）配以 UV (254, 330, 365-460 nm) 以及 MS(ES+)，進行分析確定。

## 2. 煎魚油煙萃取物處理 CL-3 細胞

步驟如上所述。

## 3. DNA 鍵結物之分析

上述經過油煙處理之人類肺癌細胞株 CL-3 的 DNA 經萃取純化及定量後，取 5 μg DNA 加入 7 μl 的酵素混合物其中含有 MN (7.5 U) 和 SPD (7.75 μg) 和 100 mM sodium succinate pH 6.0，混合均勻後在 37°C 水浴中培育 14 小時，經離心除去懸浮物，含有 MDA-DNA adducts 的上清液以濃縮機弄乾後再溶於蒸餾水中。取 5 μl DNA 弄乾後，加入 1 μl 的 NP1 (1.25 μg), 2.4 μl 的 0.25 M sodium acetate, pH 5.0 和 1.4 μl 的 0.3 mM ZnCl<sub>2</sub>，在 37°C 下培育一小時，完成水解 DNA 的過程。然後開始進行 phosphorylation 反應，取 1 μl DNA 樣品和 1 μl 的混合反應物，其中包括有 1.2 pmol 的 [γ-<sup>32</sup>P]ATP, 1.2 U T4 polynucleotide kinase, 40 mM bicine-NaOH, pH 9.6, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine 和 20 mM dithiothreitol。以上混合液先離心 10 秒鐘後，移至 37°C 水浴中培育一小時，加入 20

mU 的 apyrase 和 10 mM bicine-NaOH, pH 9.6 後，再繼續培育三十分鐘。此混合物 (2  $\mu$ l) 即點至 10 x 10 cm 的 PEI TLC plate 上，進行 two-dimensional 色層分析，第一個方向的移動相是 3.5 M ammonium formate, pH 3.5, 然後將 TLC plate 放入水浴中清洗兩次各七分鐘，等到完全乾了以後，再進行第二方向的色層分析，其移動相為在 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5 中含有 0.5 M ammonium sulfate。然後再以水洗過等乾了之後，以 Kodak XAR-5 底片進行 autoradiography。顯影與定量的步驟同上所述。

## 十二、HPLC 分析煎魚油煙在 CL-3 細胞所形成 PAH-DNA 鍵結物

利用前述的方法將 DNA 以酵素水解為單一核苷酸後以 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 標記 DNA 鍵結物，然後利用 0.65 M sodium phosphate (pH 6.0) 展開，將正常的核苷酸移除。將展開後的 TLC 片子上原點位置的 PEI 刮下置於 1.5 ml 的 eppendorf 管內，加入 500  $\mu$ l 4.0 M pyridinium formate (pH 4.5) 以 vortex mixer 激烈震盪以萃取附著於 PEI 上的 DNA 鍵結物，然後以 12000 rpm 的速度離心 10 分鐘，取上清液，接著以 Speed Vac 減壓濃縮後溶於 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.5) 中。以 Waters 600 E 之 HPLC 分析其中的 BPDE-DNA 鍵結物。HPLC 分析的條件大致如 Robertson (1986) 所述。所用之管柱為 Merck RP-18 column (particle size 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm i.d.)，流速為 1 ml/min，以 A=NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (500 mM, pH 2.5) 和 B = methanol 為移動相，以 linear gradient 的方式分離，分析時間為 90 分鐘。收集每分鐘的沖出液，加入閃爍計數液以 Beckman L-6500

Scintillation Counter 測定其放射性強度。欲定性其中的 DNA adduct 所以利用單獨的已知毒物 例如 B[a]P, B[b]FA, 在 CL-3 cell 所造成的 DNA adduct 做爲標準物。分離出來的尖峰直接用 radioactivity detector 監視。以上實驗步驟主要依照 Hughes *et al.* (1993) 的方法。

### 十三、LC-MS 鑑定煎魚油煙所形成鍵結物

#### 1. 鑑定在 CL-3 所形成之主要 PAH-DNA 鍵結物

將 0.5 mg FOSC 處理 CL-3 細胞 24 小時後的 DNA 進行 nuclease P1 與 alkaline phosphatase 水解，並以 0.2  $\mu$ m 濾膜過濾此樣品以進行 LC-MS 之分析，其流動相爲：H<sub>2</sub>O/acetone = 1/1，0.1% formic acid 流速爲 10  $\mu$ l/min。以 LC-MS ( VG platform II, Fison ) 的 Mass Lynx data system 分析。

#### 2. 鑑定在 CL-3 所形成之 MDA-DNA 鍵結物

步驟如上所述。

### 十四、TBA 方法測定 MDA 之生成

分析 MDA 生成的方法主要參考 Wills (1987)、Biaglow (1997) 的



步驟進行。其原理是細胞脂質過氧化時以及 deoxyribose degradation 生之 MDA 會與 thiobarbituric acid (TBA) 形成粉紅色之產物，在 OD532 nm 可偵測到。

## 1. 小牛胸腺 DNA 之處理

其步驟為以不同濃度的 FOSC 處理 250  $\mu\text{g}$  小牛胸腺 DNA，在 1 ml 的反應液中包含 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ 、25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  分別在 S9 mix. 存在與不存在下，100 $^{\circ}\text{C}$  水浴震盪 (180 rpm) 培育 1 小時後，分別加入 25  $\mu\text{l}$  20 mM 的 butylated hydroxy-toluene (BHT)、1ml 0.7% 的 TBA 以及 1 ml 2.8% 的 trichloroacetic acid (TCA)。充分混合後，在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴中煮沸 10 分鐘後置於冰上。取 2 ml 以 10000g 離心 10 分鐘後，取上清液測 A532nm。

## 2. 處理 CL-3 細胞

培養於 10 cm dish 中的 CL-3 細胞以 TE 處理下來，取 500  $\mu\text{l}$  PBS 中含有  $1 \times 10^6$  細胞移到 13  $\times$  100 mm 的 glass culture tube 中加入 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ 、25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  與不同濃度 FOSC 作用，使反應體積為 1 ml，100 $^{\circ}\text{C}$  水浴震盪 (180 rpm) 培育 1 小時後，分別加入 BHT、TBA 以及 TCA (步驟同上)，最後測 A532nm。

## 十五、Xanthine oxidase 活性之分析

由於 xanthine oxidase 是細胞內生成游離基的主要酵素之一，若欲了解經過油煙處理的肺細胞是否生成游離基活性，必須先分析此酵素的活性是否有改變。此酵素的分析是依照 Noro *et al.* (1983) 的方法進行。每次分析之混合物中含有 0.5 ml 的不同濃度之炒肉油煙、1.45 ml 的 1/15 M phosphate buffer (pH 7.5) 和 0.05 ml 的酵素溶液 (0.08 U/ml, Sigma)。此反應是由加入 1 ml 的 0.15 mM xanthine 到反應液中開始，整個 xanthine/xanthine oxidase 反應生成 urate，可以 290 nm UV spectrophotometer 測定其吸光值。

## 十六、8-OH-deoxyguanosine 之分析

### 1. 處理小牛胸腺 DNA

以 200  $\mu\text{g}$  小牛胸腺 DNA 和不同濃度的 FOOSC 與 B[a]P 在 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  以及 S9 mix. 存在下，作用 2 小時 (Toyokuni and Sagripanti 1996) 進行 DNA 萃取 (步驟如上)。

### 2. 處理 CL-3 細胞

以不同濃度的 FOOSC 在 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  存在下，處理 CL-3 細胞 0 ~

24 hrs 後，進行 DNA 萃取 ( 步驟如上 )。

### 3. ECD/UV HPLC 之分析

上述經 FOSC 處理過的小牛胸腺 DNA 或 CL-3 細胞 DNA，經 nuclease P1 以及 alkaline phosphatase 水解後，經過 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter 過濾後，注射入 C-18 column 以 electrochemical detector (ECD) 偵測之。其移動相為 50 mM phosphate buffer solution ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 5.5 中含有 10% 的 methanol (Richter *et al.*, 1988)。

### 4. LC-MS 之分析

上述經 FOSC 處理的 DNA 經 nuclease P1 以及 alkaline phosphatase 水解後 ( 同上 ) 進行 LC-MS 偵測，流動相為  $\text{H}_2\text{O}/\text{acetone} = 1/1$ ，流速為 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  ( 同上 )。

### 十七、細胞 p53 蛋白之免疫染色分析 (Immunocytostaining)

將 CL-3 細胞種在 24 個 wells dish 中，每個 well 為  $1 \times 10^5$  細胞，24 小時候，以不同濃度 B[a]P、B[b]FA、FOSC 處理 (4, 18, 24) 小時，洗去 medium，以 PBS buffer 沖洗三次；以  $-20^\circ\text{C}$  的 methanol 固定 1 min 後，以 PBS buffer 沖洗三次；加入足夠蓋滿所有細胞的 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，在室溫下反應 15 分鐘，以阻斷細胞本身內源性的過氧化酵素，避免干擾結果

的判讀。以 PBS buffer 沖洗三次，加 80  $\mu$ l diluted p53 primary antibody，於 37 $^{\circ}$ C 中反應 90 分鐘，以 PBS buffer 沖洗三次；加上足夠覆蓋的 linking antibody 於 37 $^{\circ}$ C 中反應 20 分鐘，以 PBS buffer 沖洗三次；加上 streptavidin-horseradish peroxidase 於 37 $^{\circ}$ C 中反應 20 分鐘，以 PBS buffer 沖洗三次；加 DAB chromogen solution (DAKO com.) 覆蓋即可，於室溫下反應 10 分鐘後，以 PBS buffer 沖洗三次；以 Hematoxylin 進行 counter-staining 30 秒，以清水沖洗後，以 100% alcohol 覆蓋並風乾。

#### 十八、DNA 單股斷裂之氧化性傷害分析

DNA 單股斷裂之氧化性傷害分析主要依照 Martine *et al.* (1991) 的 nick translation assay 步驟進行。將處理不同濃度 FOSC 的 WI-38 細胞，TE 處理下來後，以 Hemacytometer 測細胞數目，取 200  $\mu$ l PBS 中含有  $5 \times 10^5$  細胞於 eppendorf 中，置於冰上，以 1000 rpm 1.5 min 將細胞離下後，倒掉上清液，加入 50  $\mu$ M dATP, 50  $\mu$ M dCTP, 50  $\mu$ M dGTP, 3  $\mu$ Ci/ml d[methyl- $^3$ H]-thymidine, 40 u/ml DNA polymerase I, 50  $\mu$ g/ml BSA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1x polymerase I buffer，使反應總體積為 100  $\mu$ l，在室溫中反應 40 分鐘後，將 100  $\mu$ l 的反應液加到濾紙上並以 2% pyrophosphate 沖洗以終止 DNA polymerase I 的反應，再以 5% TCA (含有 1% pyrophosphate) 沖洗後，以 ether 快速沖一下，風乾後，以 Liquid scintillation counter (Beckman Instrument, USA) 測定濾紙上的放射性強度，並以下列公式表示 DNA 斷裂的程度： $[ \text{Sample} - Y (\text{不加 polymerase I 的空白組}) ] \div [ X (\text{有加 polymerase I 的空白組}) - Y ]$ 。

## 十九、自由基對 DNA 鏈結物形成的影響之分析

主要參考 Randerath *et al.*, (1992) 的方法，利用不同濃度 (5 ~ 200 mM) 的 ascorbate 和 100 mM DTT 作為自由基清除劑分別與 0.5 mg FOOSC 以及 0.2  $\mu$ M B[a]P 在 37 °C 中進行前處理 1 小時後，處理 CL-3 細胞 24 小時後，進行 PAHs-DNA 鏈結物的  $^{32}$ P-postlabeling 分析。

## 伍、結果與討論

### 一、炒肉油煙之收集與萃取

#### (一) 比較豬肉與魚肉油煙懸浮微粒含量和其丙酮萃取物

爲了分析油煙中主要基因毒物與致突變物，本實驗以一般家庭烹調方式進行油煙之收集與分析。首先在生鮮超市（台中大買家）與傳統市場分別購得白鯧魚（white-pomfret）四條（共約1公斤），與里脊豬肉（3.5公斤），在不銹鋼鍋內以大豆沙拉油分別烹調之。爲了減少變因，烹調過程中不添加任何調味料。所生成的油煙以高量空氣採集器分別收集（ $1\text{ m}^3/\text{min}$ ）於玻璃纖維濾紙上，再以丙酮有機溶劑萃取之。過程之記錄與結果整理於Table 1和2中；每條白鯧魚以15 ml 沙拉油煎5分鐘，每次煎一條，共煎四次。豬肉絲以10 ml 沙拉油快炒2分鐘，每次炒200克，共炒18次。烹調過程溫度之變化皆控制一致，當溫度達 $180\text{ }^\circ\text{C}$ 時開始烹調，肉下鍋後溫度會下降至 $150\text{ }^\circ\text{C}$ ，然後會逐漸升高約達 $250\text{ }^\circ\text{C}$ ，最後熄火前溫度爲 $180\text{ }^\circ\text{C}$ 。萃取前所收集到的煎魚油煙與炒豬肉油煙之懸浮微粒分別爲 $450\text{ mg}/\text{m}^3$ 與 $1264\text{ mg}/\text{m}^3$ ，換算成每分鐘每克肉所產生的油煙懸浮微粒，分別爲 $21.6\text{ }\mu\text{g}/\text{g meat}/\text{min}$ 與 $10.0\text{ }\mu\text{g}/\text{g meat}/\text{min}$ 。經丙酮萃取後，所得萃取物分別爲 $382\text{ mg}/\text{m}^3$ 與 $1115\text{ mg}/\text{m}^3$ ，相當於 $18.3\text{ }\mu\text{g}/\text{g meat}/\text{min}$ 與 $8.8\text{ }\mu\text{g}/\text{g meat}/\text{min}$ 。由此結果可知，以一般家庭烹調方式，相同重量下每分鐘煎魚所產生的油煙懸浮微粒比炒豬

肉多 2.2 倍。本研究室過去曾利用四種不同的肉類（魚肉、豬肉、牛肉、雞肉），以三種不同的食用油（沙拉油、葵花油、豬油）分三次炒，所得的十二種油煙中以豬油炒魚肉所生成的油煙最多、其次為沙拉油炒魚肉(Yang *et al.*, unpublsh data)，而家庭中主要食用油為沙拉油，因此本實驗選用沙拉油進行烹調。

## 二、油煙萃取物中主要直接致突變物之分析與鑑定

爲了確定烹調所生成之油煙的基因毒物，我們將所收集到的油煙懸浮微粒之丙酮萃取物，經由一系列的純化分析確定油煙中主要直接致突變性和間接致突變性的化合物 (Fig. 1)。

### (一) 直接致突變性分析

爲了瞭解油煙萃取物是否具有直接攻擊 DNA 的能力，我們先以 Ames test 對 TA98 菌種，在不添加哺乳類肝臟活化酵素之下，分析其直接致突變性，結果發現煎魚油煙粗萃取物每 0.5 mg 可誘發 82 個反突變菌落數，爲控制組之 4.8 倍的致突變性、每 1.0 mg 可誘發 102 個反突變菌落數，爲控制組之 6 倍的致突變性 (Fig. 2)。而炒豬肉油煙粗萃取物每 0.5 mg 可誘發 42 個反突變菌落數，爲控制組之 2.5 倍的致突變性、每 1.0 mg 可誘發 44 個反突變菌落數，爲控制組之 2.6 倍的致突變性。若換算成每克肉所產生的油煙之反突變菌落數，發現每克魚肉所產生的油

煙具有控制組 3.5 倍的致突變性，而每克豬肉所產生的油煙具有控制組 2.4 倍的致突變性。比較兩種油煙粗萃取物在 TA98 菌種之直接致突變性，具有統計上之顯著性差異，其  $P < 0.05$  (Fig. 2)。即煎魚油煙懸浮微粒之丙酮萃取物比炒豬肉的油煙懸浮微粒之直接致突變性還高。此差異可能是魚所接觸鍋面的表面積比豬肉大，且魚肉內的水分較多也較易將參與形成致突變物之前驅物，例如醣類、胺基酸等生物有機成份溶出。因此肉類中的水分，對於油煙的致突變物有一定程度的影響 (Berg *et al.*, 1990)。

## (二) 油煙萃取物中主要直接致突變物之純化

### 1. 半製備型管柱之 HPLC 純化

爲了確定油煙中的主要直接致突變物，將產生懸浮微粒較多及直接致突變性較強的煎魚油煙粗萃取物 (FOSC)，先經半製備高效液態層析 (semi-preparative HPLC) 的純化。首先將已過  $0.2 \mu\text{M}$  之濾膜的 FOSC 經半製備型管柱 (Spheris-ORS S10 ODS2) 分離與純化，其流動相條件爲 methanol/MCI buffer = 80/20，流速爲 2.5 ml/min，將每分鐘所收集之沖提液進行 TA98 菌種之直接致突變性分析，發現主要致突變性發生在滯留時間 22 分鐘 (retention time, Rt 22)，具有 549 個反致突變菌落數剛好和標準品 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP) 出現的位置一致 (Fig 3)。再以光二極體掃描分析此尖峰之 UV 光譜 (Fig. 4)；發現此尖峰樣品在



289.3 nm 有一主要的吸收波峰，和 1,6-DNP 標準品的主要吸收光譜一致，亦在 289.3 nm 有一吸收波峰。爲了大量收集主要直接致突變物，我們連續注射 20 次，每次 1 mg 的 FOSC，分三區收集將其沖提液分成三個區域收集之；第 I 區爲 0 - 19 分鐘，第 II 區爲 20 - 27 分鐘，第 III 區爲 28 - 70 分鐘。所收集之沖提液經減壓濃縮後，取各區之 1/20 的量，相當於原注射 1 mg FOSC 的量，進行 TA98 之直接致突變性分析。發現三區皆有致突變性；第 I 區具有控制組 4 倍的致突變性，第 II 區具有 1276 倍的致突變性，第 III 區具有 8 倍的致突變性，令人驚訝的是第 II 區竟占總致突變性的 99% (Table 3)。

## 2. 1,6-DNP-DNA 鍵結物之分析

爲了確定油煙中確實含有直接致突變物 1,6-DNP，分別將 1,6-DNP 標準品、1 mg 的 FOSC 以及上述經 HPLC 分析純化的第 II 區沖提液，取相當原注射 0.5 mg FOSC 的量，以分析 nitropyrene-DNA adduct 的 <sup>32</sup>P-postlabeling 方法，在 xanthine oxidase 和 catalase 活化酵素存在下與裸露的小牛胸腺 DNA 反應 21 小時後所形成之 DNA 鍵結物，在 PEI 片上展開結果發現 1,6-DNP 標準品與小牛胸腺 DNA 所形成五個的 DNA 鍵結物 (Fig.5-A; Spot 1~Spot 5)。其中最主要的是 Spot 4，和已被證實之 N-(deoxyguanosine-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene (dG-C8-ANP) 的移動位置相似 (Fig. 5)，攻擊在 deoxyguanosine 的 C8 位置 (Beland *et al.*, 1990; 1993)，也是目前唯一化學構造被確定的 1,6-DNP-DNA 鍵結物。

而 HPLC 純化的第 II 區濃縮液與小牛胸腺 DNA 所形成的鍵結物 (Fig.5-C) 亦可發現和 1,6-DNP 標準品所形成的 DNA 鍵結物有類似位置的五個點，此五點中又以 Spot 4 為最主要。在 Fig.5-B 中可清楚地發現未經純化之 FOOSC，在 xanthine oxidase 和 catalase 酵素活化下與裸露的小牛胸腺 DNA 所形成的鍵結物，會在 PEI 片上形成兩條對角線的帶狀區域 (DRZ1 和 DRZ2)，但很難辨識出有 1,6-DNP-DNA 鍵結物的形成。若以 FOOSC 處理肺腺癌 CL-3 細胞，所形成的 DNA 鍵結物在 PEI 片上的層析圖譜 (Fig.5-E) 發現有一條 DRZ，並在此區域中有一主要的 DNA 鍵結物 (Spot 6)，在此 PEI 片子中也未發現 1,6-DNP-DNA 鍵結物形成。由於 FOOSC 無論與小牛胸腺 DNA (Fig.5-B) 或肺腺癌 CL-3 細胞 (Fig.5-E) 作用，皆可發現此重要的 Spot 6，因此 Spot 6 可能是 FOOSC 中重要基因毒物所形成的。本實驗室先前的研究 1,6-DNP，在不同人類肺細胞株上形成 DNA 鍵結能力之比較分析，結果發現 1,6-DNP 對 MRC-5 正常肺細胞株會形成最高量的 DNA 鍵結物，其次為 WI-38 (正常肺細胞株)，而 Calu-1、CL1-0、CL1-2、CL-3 等四種人類肺癌細胞株，沒偵測到任何 1,6-DNP-DNA 鍵結物，顯示 1,6-DNP 攻擊正常肺細胞的能力似乎比攻擊肺癌細胞的能力更強 (Tang and Lee, 1996 unpublished data)。

### 3. 1,6-DNP-DNA 鍵結物之質譜 (LC-MS spectra) 鑑定

爲了進一步確定油煙中確實含有 1,6-DNP，且會與 DNA 形成鍵結物，如上述分別將 1,6-DNP 標準品與 1 mg 的 FOOSC，在 xanthine

oxidase 和 catalase 活化酵素存在下與裸露的小牛胸腺 DNA 反應 21 小時後所形成之鍵結物。取 50  $\mu$ g DNA 以 nuclease P<sub>1</sub> 與 alkaline phosphatase 水解後，以 0.2  $\mu$ m 濾膜過濾，進行 1,6-DNP-DNA 鍵結物的質譜鑑定 ( Fig. 6 )。其流動相為：H<sub>2</sub>O/ acetone = 1/1，0.1 % formic acid 流速為 10  $\mu$ l/min。由於 1,6-DNP 攻擊 deoxyguanosine C8 的位置，而形成 N-(deoxyguanosine-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene(dG-C8-ANP) 鍵結物，其質量為 525 m/z，結果發現在標準品 1,6-DNP 合成的 1,6-DNP-DNA 鍵結物與油煙 FOOSC 合成的 DNA 鍵結物中，皆有發現 525 m/z。若 dG 上的 deoxyribose 斷裂後，形成 N-(guanine-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene 鍵結物，其質量為 410 m/z，若被一個鈉離子接上的話，則為 432 m/z，分別在 Fig.6-A 與 Fig.6-B 中偵測到。證實煎魚油煙中確實含有 1,6-DNP，且會與小牛胸腺 DNA 形成 N-(deoxyguanosine-8-yl)-1-amino-6-nitropyrene(dG-C8-ANP) 鍵結物。本研究室過去將魚肉絲以快炒方式所產生的油煙在 *Salmonella typhimurium* YG1024 也證實有 1,6-DNP-DNA adducts 的產生，且其強度較本實驗所得結果還高 ( Yang and Lee, unpublished data )。Smith *et al.* (1995) 將不同劑量的 1,6-DNP 直接注射於 F344 老鼠的體內，結果發現在肺臟與肝、腎等器官組織，都有 dG-C8-ANP 鍵結物的產生，且以肺臟中最多，較肝臟中高了 10 倍之多。顯示 1,6-DNP 對肺臟組織細胞所造成的 DNA 傷害可能較其他細胞為強 ( Smith *et al.*, 1994; 1995 )。過去亦有學者報告指出將 0.15 mg 1,6-DNP 直接注射到 F344 老鼠體內，會造成鱗狀細胞癌 ( Maeda *et al.*, 1986 )。13 mg 1,6-DNP 直接灌入倉鼠氣管內，則會引起肺腺癌 ( Takayama *et al.*, 1985 )。因此 1,6-DNP 可能是一種會引起肺腫瘤發生頻率較其他器官

組織為強的肺致癌物 (Smith *et al.*, 1995)。為了解其致癌的分子機轉，Bold *et al.*, (1991) 以 shuttle vector pS189 含有 tyrosine amber suppressor tRNA (sup F) 基因處理過 1,6-DNP 後再送進人類 293 細胞，研究 1,6-DNP 對 sup F 基因的突變特異性，結果顯示會引起 G : C → T : A 鹼基更換突變 (base-substitution mutation)，同時也會在五個嘌呤的 DNA 序列引起 -1 結構移位突變 (frameshift mutation)。而 1,6-DNP 也會造成 HPRT 基因的突變，且其特異性以鹼基更換突變為主，佔了 75%，其中又以 A : T → C : G 以及 G : C → C : G 的換異突變 (transversion mutation) 為主要的突變形式。

#### 4. 分析級管柱之 HPLC 純化

將所收集之第 II 區濃縮液以分析級管柱 (Merck RP-18) 進行第二次的 HPLC 純化，流動相條件為 methanol/MCI buffer = 65/35，流速為 1.0 ml/min，同樣以 TA98 菌種進行 Ames test 以偵測每分鐘沖提液的直接致突變性，結果發現在第 5 分鐘之區分，出現最強之直接致突變性，相當於每 10 μg FOSC 中有 2512 個反致突變菌落數，即有 126 倍控制組的致突變性 (Fig. 7)。由於其滯留時間較前，因此推測此主要直接致突變物屬於高極性的化合物。

在第 55 分鐘區分 (標準品 1,6-DNP 的滯留時間) 沒有偵測到致突變性，若提高 FOSC 的量進行 Ames test，且改變沖提液比例為 methanol/ MCI buffer = 75/25，則在第 23 分鐘區分 (標準品 1,6-DNP 的

滯留時間) 可偵測到致突變性，相當於每500  $\mu\text{g}$  FOSC 中有 69 個反致突變菌落數 ( data not shown )，因此 FOSC 中 1,6-DNP 之含量可由 1,6-DNP 標準品與沙門氏桿菌 TA98 菌種之直接反致突變菌落數的標準曲線 (Fig. 8) 來換算；結果每 mg FOSC 中 1,6-DNP 之可能含量為 0.05 ng，相當於煎一條重 260 g 的魚，在五分鐘內可產生 4.7 ng 的 1,6-DNP，此量為台灣地區空氣懸浮微粒中 1,6-DNP 的三倍量 (Lee *et al.*, 1995)。而本實驗室過去在炒魚肉油煙中亦發現有非常高量的 1,6-DNP，其含量為 10.39  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  相當炒一條重 260 g 的魚，在五分鐘內可產生 30  $\mu\text{g}$  的 1,6-DNP (Yang and Lee unpublished data)，此量為台灣地區空氣懸浮微粒中 1,6-DNP 的 17857 倍量 (Lee *et al.*, 1995)。與本實驗的差異，可能因烹調過程的差異使然；在本實驗中以煎的烹調方式，處理整條魚，且盡量符合一般家庭烹調方式，溫度為 (150 ~ 250  $^{\circ}\text{C}$ )。Bergetal. (1988) 發現所生成的油煙之致突變物種類，和烹調溫度有關，隨著溫度升高，油煙內間接致突變性有增加的趨勢。過去本實驗室分析台灣地區四個都會區空氣中，主要致突變化合物可能是 DNP (Chou and Lee, 1990; Lee *et al.*, 1994b,d)，並發現露天燃燒垃圾等廢棄物，會產生 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 含量，較其他國家高 100-1000 倍的可能原因之一 (Lee *et al.*, 1995a)。本研究發現煎魚油煙中含有較室外更多的 DNP 含量，可見在台灣空氣中，無論室外、室內的空氣中都含有高量的 1,6-DNP，因此了解 1,6-DNP 在台灣居民引起肺癌的角色，是值得研究探討的重要課題。

FOSC 經半製備型管柱之 HPLC 純化後，致突變性明顯的增加至少 200 倍以上 (Table 3)。而將其主要致突變區 (Fraction II) 進行第二

次 HPLC 純化後，主要致突變性又增加 10 倍 (Fig 7)。顯然的，在 FOSC 可能同時存在著一些可抑制直接致突變性的物質，經 HPLC 純化後被分離，而顯出直接致突變物真正致突變性。混合型之污染物中的多環芳香羣之間會發生交互作用 (interactive effect)，使得實際對生物體的影響和單獨一個化合物所得的結果有相當大的差異。本研究室最近即發現多環芳香羣會改變 1-NP 的代謝活化路徑，而抑制 1-NP 的致突變性 (Lee and Cherng, 1994)。而另一原因可能與 Smimada (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羣的致突變能力有關，以 1,6-DNP 與 1,8-DNP 為例，轉移單電子的還原酵素會使 1,6-DNP 與 1,8-DNP 直接致突變能力降低。而在 FOSC 的氧化性傷害分析中，發現 FOSC 對 xanthine oxidase (屬於轉移單一電子的硝基還原酵素) 的活性具有正向濃度線性關係 (Fig.23)。因此混合狀態之 FOSC 的直接致突變性遠低於經過 HPLC 純化的活性區分。

## 5. UV 吸收光譜分析

利用光二極體偵測器掃描此第二次 HPLC 分析之第 5 分鐘的 UV spectrum，發現其在 256.5 nm 有一最主要的吸收波峰 (Fig.9)，由此吸收光譜顯示此未知致突變物可能具有苯環結構。

## 6. 紅外線吸收光譜 (infrared spectrophotometry, IR) 與質譜 (

## LC-MS spectra) 之鑑定

爲了了解此未知化合物具有那些官能基及主要致突變物爲何？將大量收集第二次 HPLC 之 4 ~ 6 分鐘的沖提液，以進行 IR ( Perkin Elmer Model-883 ) 與 LC-MS ( Fison VG platform II ) 之鑑定分析。在 IR 之圖譜鑑定是由靜宜大學理學院院長林孝道教授研究室協助分析鑑定 ( Fig.10 )，此 IR 結果須配合 LC-MS 的分析結果 ( Fig.11 )。初步證實 FOOSC 中主要直接致突變物具有苯環 (  $1576.87\text{ cm}^{-1}$  )、酚 (  $1373.38\text{ cm}^{-1}$ ,  $1344.31\text{ cm}^{-1}$  )、C=C 雙鍵 (  $1635.01\text{ cm}^{-1}$  )、-OH (  $3422.98\text{ cm}^{-1}$ ,  $2922.07\text{ cm}^{-1}$ ,  $1712.53\text{ cm}^{-1}$ ,  $1373.38\text{ cm}^{-1}$ ,  $1118.21\text{ cm}^{-1}$  )、-NO<sub>2</sub> (  $1635.01\text{ cm}^{-1}$ ,  $1373.38\text{ cm}^{-1}$ ,  $1344.31\text{ cm}^{-1}$  ) 等官能基的吸收波峰。

在 LC-MS 鑑定方面，FOOSC 中主要直接致突變物純化區分以 LC-MS ( VG platform II, Fison ) 的 Mass Lynx data system 分析，其流動相爲：MeOH/H<sub>2</sub>O=1/1 含有 0.5 % amonia，流速爲 0.1 ml/min，結果發現其主要質量 爲 191 m/z ( Fig.11 )，推測其爲含有一個 nitrite group 與 hydroxy group 的 nitro-naphthol。若其 nitrite group 斷裂的話，則其質量 爲 143 m/z，結果在質圖上確實有 143 m/z。若其 hydroxy group 被一個鈉離子接上的話，則分子量爲 213 m/z、若被兩個鈉離子接上的話，則質量變爲 235 m/z。結果在層析圖上皆可發現 213 與 235 m/z。證實此物質可能爲 Nitro-naphthol。而目前確定的 nitro-naphthol 爲 1-Nitro-2-naphthol ( 1-Nitro-2-naphthalenol;  $\alpha$ -nitro- $\beta$ -naphthol; 1-nitro-2-hydroxynaphthalene )。因此推測此物質可能爲 1-Nitro-2-naphthol。爲了進一步證實我們的推測，因此將此物質與 1-Nitro-2-naphthol 標準品 ( 分

子量為 189 ) 作 LC-MS 之比對分析( Fig .35 )。由於 1-Nitro-2-naphthol 在 ES+ 的條件下 (以流動相為 acetone/H<sub>2</sub>O = 1/1 含有 0.1% formic acid , 流速為 10  $\mu$ l / min ) 所偵測到為 m / z = 190 ( 在 ES- 所偵測 m / z 為 191 )。若脫落一個氧原子, 則 m / z = 174 , 結果發現在所純化的 FOOSC 樣品有 1-Nitro-2-naphthol 質譜。

因此除了 1,6-DNP 以外, 我們首先在煎魚油煙中也發現另一種直接致突物— 1-Nitro-2-naphthol。而此化合物在油煙中對 TA98 直接致突變性至少有 250 個反突變菌落數 /  $\mu$ g。

Suzuki *et al.* (1988) 發現燃燒不完全所產生之 2-naphthol , 在含有 nitrite 的水溶液中, 會產生 7 種主要光化產物, 其中含有 1-Nitro-2-naphthol , 並推測其形成路徑如 Fig.36 所示: 在光化反應下 , 2-naphthol 會形成帶自由基的 naphthoxy radical , 而和 nitrite 自由基形成 1-Nitro-2-naphthol , 並且會在有氧存在下, 形成未知的強致突變物 ( Suzuki J. *et al.*, 1988 a,b.)。1-Nitro-2-naphthol 對人類肺細胞是否具有致突變能力或也會誘發細胞發生氧化性傷害, 將進一步進行細胞毒性分析、DNA 鍵結物及氧化性傷害的分析。

1,6-DNP 與 1-Nitro-2-naphthol 都屬於硝基多環芳香烴 ( nitro-PAHs ) , 過去學者認為 nitro-PAHs 的高致突變性表現, 主要是經由還原酵素與乙醯化酵素來完成( Neft *et al.*, 1993 ) , 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 nitro-PAHs , 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，如 1-NP、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-DNP、1,8-DNP 的代謝活化即是以此還原酵素進行 (Rosenkranz *et al.*, 1986)。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，主要也是存在於細胞質中 (Djuric *et al.*, 1985)。Hajos *et al.*, (1991) 進一步發現肝臟細胞質之還原酵素 NAD(P)H-quinone oxidoreductase 也能將 1,6-DNP 進行雙電子還原作用，還原後的 N-hydroxy-1-amino-6-nitropyrene 可直接攻擊 DNA，或再被乙醯化成 N-hydroxy-1-amino-6-nitropyrene 可直接攻擊，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 deoxyguanosine C8 位置，所形成的鍵結物已被鑑定為 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)。

而代謝 nitro-PAHs 的酵素系統在進行 redox cycling 過程中，是否也會對細胞造成氧化性傷害為進一步研究的課題之一。

### 三、油煙萃取物中主要間接致突變物之鑑定

## (一) FOSC 在沙門氏桿菌 TA98 與 TA100 之致突變性分析

爲了了解油煙之間接致突變性，同樣利用 Ames test 方法在肝臟酵素 S9 混合液存在下，分別以沙門氏桿菌 TA98 與 TA100 兩種菌種進行 FOSC 之間接致突變性分析 (Table 4)。結果發現 FOSC 從 0.1 mg 到 1.5 mg 皆對 TA98 與 TA100 兩種菌種具有間接致突變性。而且在 TA98 上具有線性濃度效應關係 ( $P < 0.05$ )，在 TA100 菌種則無線性濃度效應關係。若與直接致突變性 (-S9) 比較，無論在 TA98 ( $P < 0.025$ ) 或 TA100 ( $P < 0.025$ ) 皆有非常顯著的差異。從 0.1 mg 到 1.5 mg，無論那一個濃度的油煙 FOSC，對 TA98 或 TA100 的間接致突變性都比直接致突變性強，例如 0.5 mg 的油煙 FOSC，對 TA98 具有控制組 4.8 倍是直接致突變性，控制組 14.4 倍的間接致突變性，以及對 TA100 具有控制組 1.7 倍是直接致突變性，控制組 6.7 倍的間接致突變性；顯示在油煙中存有直接與間接致突變物，且間接致突變物對攻擊 DNA 的能力比直接致突變物強。因此 FOSC 的致突變性以間接致突變性爲主 (Table 4)，因此推測油煙中引起致突變性的化合物，可能主要是必須經由酵素代謝活化後，才能表現出致突變性的 PAHs 化合物。同時比較 FOSC 在 TA98 與 TA100 兩種菌種之致突變性的差異 (Table 4)，發現無論是直接致突變性 (-S9,  $P < 0.01$ ) 或間接致突變性 (+S9,  $P < 0.05$ ) 皆有非常顯著的差異 (Table 4)，從 0.1 mg 到 1.5 mg，無論那一個濃度的 FOSC，對 TA98 的致突變性都比 TA100 強，而 TA98 代表 fram-shift，TA100 代表 base-

pair substitution。由此可知油煙中含有引起結構移位突變 ( frame-shift mutation ) 和鹼基更換突變 ( base-pair substitution ) 的化合物，但引起結構移位突變的能力較引起鹼基更換突變的能力強。

FOSC 中所含直接致突變似乎不會造成鹼基對更換突變 (TA100) 而只會造成結構移位突變 (TA98) (Table 4)，同時發現其間接致突變物造成結構移位突變約為鹼基對更換突變的三倍 (Table 4)。而 Wang *et al.*, (1997) 分析台灣地區肺癌 p53 基因 exon 4-11 的突變輿圖，發現在 G :C 配對或有重複序列處發生 1-12 bp 的缺失突變，推測造成此缺失突變和吸菸以外的環境因子有關。因此從本實驗的 Table 4 初步分析判斷，似乎可對此研究，提出一些線索。除此以外，在油煙 PAH-DNA 鍵結物分析鑑定發現，主要為 BPDE-N<sup>2</sup>-dG 鍵結物 ( Fig. 22 )。過去研究發現 BPDE 和 DNA 形成鍵結物有 95% 攻擊在 guanosine 上 ( Osborne *et al.* ,1981; Straub *et al.*, 1977)，BPDE 所產生的突變，主要為 G : C → T : A (transversion) 為主 (Yang *et al.* ,1991; Wei *et al.* ,1994)，但分析油煙的致突變物，至少含有 nitro-PAHs，PAHs 和 HAs (異環胺類) 三類化合物，都能引起結構移位突變 ( framshift mutation)，似乎有些相關，但仍須進一步的研究。

## (二) 油煙萃取物中多環芳香煙之鑑定

爲了了解油煙中有那些主要的多環芳香煙化合物？其含量各爲何？因此進行以下的研究。

## 1. 油煙萃取物中多環芳香煙之純化

本試驗先以 Baker-10 管柱進行固相萃取 (solid phase extraction) 純化出油煙丙酮萃取物中的多環芳香煙類化合物，必須先找到純化出多環芳香煙的最佳條件，因此首先以九種多環芳香煙的標準品通過 Baker-10，以不同的有機溶劑和條件沖出多環芳香煙類化合物，然後再以 HPLC 分析其含量，以計算出各種多環芳香煙的回收率，結果如 Table 5 所示，多環芳香煙化合物回收率最高的是 pyrene 有 97.6%，其次是 fluoranthene(FA), B[a]P, anthracene(Anth), B[g,h,i]P, B[a]A, DB[a,h]A, B[b]FA 他們的回收率介於 92.4 ~ 82.1% 之間，而回收率最低的是 chrysene 僅有 78.96%。九種多環芳香煙的標準品之平均回收率為 88.83%。

## 2. 油煙萃取物中多環芳香煙之氣相層析儀 (GC) 定性分析

經 Baker-10 管柱所純化出來的 FOSC (FOSC-B) 與 POSC (POSC-B) 中之多環芳香煙類化合物 (PAHs)，注射入氣相層析儀中做定性分析，並與 PAHs 標準品做一比對。結果發現 FOSC-B 與 POSC-B 中之 PAHs 中都含有 Anth, FA, pyrene, B[a]A, chrysene, B[b]FA, B[a]P, B[g,h,i]P 等八種多環芳香煙化合物，其滯留時間分別為 8.22, 13.03,

13.90, 19.51, 19.84, 27.18, 30.12 和 41.55 分鐘 (Fig. 12)。而在 POSC-B 中偵測到 DB[*a,h*]A，為 FOSC 中所未偵測到的，其滯留時間為 39.95 分鐘。同時在 FOSC-B 與 POSC-B 中也都偵測到約十九種其他未知的尖峰，這都有待進一步的 GC-MS 定性分析，以確定其為何類化合物。

### 3. 油煙萃取物中多環芳香煙之 HPLC 定量分析

爲了確定油煙中 PAHs 的成分是否與氣相層析儀分析的結果相符，以及確定其中 PAHs 成分之含量，因此將經 Baker-10 管柱所純化出來的 FOSC-B 與 POSC-B 中之 PAHs 純化物注射入 HPLC 中分析，和十種 PAHs 混合標準品做一比對，發現 FOSC-B 中含有 Anth, FA, pyrene, B[*a*]A, chrysene, B[*b*]FA, B[*k*]FA, B[*a*]P 和 B[*g,h,i*]P 等九種 PAHs (Fig. 13)，POSC-B 中含有 Anth, FA, pyrene, B[*a*]A, chrysene, B[*b*]FA, B[*k*]FA, B[*a*]P, DB[*a,h*]A 和 B[*g,h,i*]P 等十種 PAHs (Fig. 14)，和 GC 分析的結果一致。爲了確定其實際含量，因此將 HPLC 分析所得之各種多環芳香煙的含量，以 PAHs 標準品之回收率來校正，而得到油煙中最主要七種 PAHs 之實際含量 (Table 6, 7)。結果發現 1 mg 的 FOSC 中約含有 1412.62 ng 的 PAHs，其含量最多爲 B[*b*]FA (319.18 ng)，最少爲 B[*k*]FA (69.48 ng)，換算成煎每條魚所產生 PAHs 的含量最多爲 B[*b*]FA (30.473 μg)，最少爲 B[*k*]FA (6.634 μg)。總共約 134.354 μg 的 PAHs (Table 6)，其中含量最多的 B[*b*]FA 佔總量 22.68% 爲 B[*a*]P 含量的 1.72 倍。而 1 mg 的 POSC 中約含有 82.43 ng 的 PAHs，其含量最多

為 pyrene (39.96 ng)，最少為 B[k]FA (1.01 ng)，換算成每炒 100 克肉所產生 PAHs 之含量最多為 pyrene (1.273  $\mu\text{g}$ )，最少為 B[k]FA (0.032  $\mu\text{g}$ )，總共約 2.575  $\mu\text{g}$  的 PAHs (Table 7)，其中含量最多的 pyrene 佔總量高達 49.44% 為 B[a]P 含量的 6.43 倍。兩種油煙之主要七種 PAHs 的成分雖然一致，但其各成分的比例卻有所差異，將兩種油煙之主要七種 PAHs 含量百分比整理於 Fig. 15 中，更可清楚地比較出兩者的差異。比較兩種油煙萃取物中各種多環芳香煙的含量時 (Fig. 16)，發現 FOSC 萃取物中七種主要 PAHs 的含量，在統計學上，都非常顯著性的較 POSC 萃取物中的多環芳香煙含量為高 (pyrene;  $P < 0.025$ , other PAHs;  $P < 0.001$ )。瑞典學者 Lofroth *et al.*, (1991) 證實烹調各類肉類食品所生成的煙霧中，具有不同程度的致突變性。Berg *et al.* (1990) 發現所生成的油煙之致突變物，和烹調時間有正相關性，也就是說烹調愈久，生成的致突變物含量愈多。且所生成的油煙之致突變物種類，和烹調溫度有關，隨著溫度升高，油煙內間接致突變性有增加的趨勢 (Berg, *et al.*, 1988)。以上原因，或許可用來說明，為何在 PAHs 含量上，FOSC 比 POSC 含量為多 (Fig. 16)。

油煙中所測到的 PAHs，在 Ames test 以及 SOS chromotest 中，除了 Anth 以外，皆已被證明具有基因毒性 (Mc Cann *et al.*, 1975; Pahlman and Pelknen, 1987; Richard and Woo, 1990; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992)。另外，有些多環芳香煙不具致癌性如 fluorene, fluoranthene, naphthalene, anthracene, phenanthrene 等，但是有些多環芳香煙如 acenophthlene, pyrene 和 coronene 等的致癌性目前尚不明瞭，仍待進一步研究。

大陸學者 Li, S.G. *et al.*, (1994) 報告指出蔬菜油和沙拉油分別加熱到  $205 \pm 5^\circ\text{C}$  時所造成的油煙含有高量的 B[a]P 和 DB[a,h]A，在蔬菜油實驗組所測的 B[a]P 為  $0.463 \mu\text{g/g}$ ，DB[a,h]A 為  $5.763 \mu\text{g/g}$ ，在沙拉油實驗組所測的 B[a]P 為  $0.341 \mu\text{g/g}$ ，DB[a,h]A 為  $3.765 \mu\text{g/g}$ 。同時他們也分析炸油豆腐店、炸麻花店和炸油條店的空氣樣品店中的多環芳香羣，結果顯示亦含有相當高量的 B[a]P 和 DB[a,h]A，因此他們認為這兩種已知的致癌物可能是造成廚師和中國婦女罹患肺癌的起始因子。和本實驗中相同的是皆含有高量的 B[a]P，但不同的是在 FOSC 中並無偵測到 DB[a,h]A，只有在 POSC 中才發現很微量的 DB[a,h]A，此外我們本實驗中也發現在 FOSC 中除了 B[a]P 外還有其他至少 8 種的 PAHs 存在 ( Fig. 13 )，其中以 B[b]FA 的含量居冠。而 POSC 中測到以 pyrene 含量最多，佔總 PAHs 的一半，而 pyrene 會與空氣進行光氧化反應而生成 1,6-DNP ( Lewtus, *et al.*, 1990 )。因此 FOSC 中含有 1,6-DNP 可能和高溫烹調狀態下，油煙之 pyrene 與環境中的 NO 產生反應而形成。

在間接致突變物的分析方面，除了 PAHs 以外，本研究室最近亦在 FOSC 中發現含有異環胺類中的 MeIQx，推算每分鐘煎每克魚會產生 0.25 ng 的 MeIQx ( Yang *et al.*, 1997 )。若以 5 分鐘內煎一條白鯧魚所產生的 1,6-DNP，MeIQx 及 5 種 PAH 的總量做一比較，發現在 FOSC 的 PAHs 中，含量最多的 B[b]FA 為 FOSC 中 1,6-DNP 含量的 6500 倍，MeIQx 的 94 倍。而 FOSC 所含 PAHs 中對 DNA 攻擊能力最強的 B[a]P 含量也比另兩種高很多；為 1,6-DNP 含量的 3800 倍，MeIQx 含量的 55 倍，FOSC 中存在著含量如此高的 PAHs，不得不重視其對人類造成的影響，特別在肺癌發生上。

#### 四、FOSC 在肺腺癌細胞 CL-3 所造成主要 DNA 鍵結物之鑑定

##### (一) 以 $^{32}\text{P}$ -postlabeling 方法分析 DNA 鍵結物

由於 FOSC 中主要 PAHs 的含量，較 POSC 萃取物中的 PAHs 含量高很多，因此以 FOSC 進行以下的研究。爲了要了解油煙之主要致突變性與形成 DNA 鍵結物能力是否相關，以  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分析 PAHs-DNA 鍵結物。

##### 1. 油煙萃取物與小牛胸腺 DNA 所形成之鍵結物分析

首先以 1 mg 的 FOSC 和小牛胸腺 DNA 在 S9 混合液代謝活化下，作用 3 小時，分析其所形成之 DNA 鍵結物，並分別以九種  $50\mu\text{M}$  的 PAHs 和 FOSC 中 PAHs 比例相同之混合 PAHs 標準品處理與小牛胸腺 DNA，以比較其間所形成之 DNA 鍵結物的差異 (Fig.17)。由 PEI 片上展開的 DNA 鍵結物層析圖譜，發現九種相同濃度的多環芳香煙皆會與小牛胸腺 DNA 形成強弱不等的鍵結物，各 PAHs 所形成之 DNA 鍵結物在 PEI 片子上均有不同的移動位置 (Fig.17-C~K)。而 FOSC 與小牛胸腺 DNA 所形成的鍵結物在 PEI 片上展開後，會出現 DRZ，並在此區域中



會形成三個主要鍵結物 (Spot 1~3)，其中 Spot 1 和 Spot 2 在層析圖譜中強度最強。在 FOSC-B 形成的 DNA 鍵結物之 PEI 片層析圖中 (Fig.17-B)，Spot 1 和 Spot 2 強度更為明顯。將油煙形成的 DNA 鍵結物分別與九種合成的 PAH-DNA 鍵結物以及和煎魚油煙中 PAHs 比例相同之混合 PAHs 合成的 PAHs-DNA 鍵結物比較，發現 FOSC 與小牛胸腺 DNA 所形成的鍵結物，在 PEI 片上的 Spot 1，Spot 2 和 B[a]P 所形成的鍵結物之位置相近 (Fig. 17-G)，而與其他 PAHs 標準品所形成之 DNA 鍵結物位置不同 (Fig. 17-E, F, H, I)，因此推測油煙形成的 DNA 鍵結物以 B[a]P 為最主要。我們將所有樣品的 DNA 鍵結物總含量整理於 Table 8 中；發現相同濃度下不同種類 PAH 合成的鍵結物總含量上有很大的差異，九種 PAHs 中以 B[a]P 所生成之 DNA 鍵結物含量最高，可達 3882.8 個，其次 B[a]A 也有 3583.04 個，其他依序為 mixed PAHs (1981.16)，chrysene (1298.38)，B[b]FA (504.46)，DB[*a,h*]A (407.41)，B[*g,h,i*]P (77.10)，pyrene (18.29)，FA (12.30)，最低者為 Anth (5.52)，在統計上都有非常顯著的差異 (Fig.18;  $P < 0.001$ )，有趣的是九種 PAHs 混合所形成之 DNA 鍵結物表現中等的強度，這表示 PAHs 化合物間可能發生交互作用所致。

## 2. FOSC 在 CL-3 細胞所形成之鍵結物分析

FOSC 對肺腺癌 CL-3 細胞所形成之 DNA 鍵結物，是否與上述處理小牛胸腺 DNA 相似？我們取不同濃度 (0.05~1.0 mg) 之 FOSC-B 處

理 CL-3 細胞 24 小時後，進行 PAHs-DNA 鍵結物之  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分析，結果在 PEI 層析圖上發現有一主要鍵結物形成，且隨著濃度的增加此點有越來越強之趨勢，當 FOSC 濃度在 0.5 mg 以上，層析圖上會形成一明顯的 DRZ，而此主要的鍵結物則位於此 DRZ 中。量化結果發現 0.05 mg ~ 1.0 mg 之 FOSC-B 在 CL-3 細胞中會形成 4.31 ~ 89.7 adducts /  $10^8$  NT，且具有線性濃度效應關係 ( Fig. 19 )，其中此主要的鍵結物在 1 mg FOSC-B 處理 CL-3 細胞產生 66.61 adducts /  $10^8$  NT，約佔總鍵結物強度之 70%。若與未經 Baker-10 純化之 FOSC 比較，在層析圖上亦有一 DRZ 和一主要的鍵結物所形成的點 ( Fig. 20-A )，但在量化結果卻發現 FOSC 在細胞中產生鍵結物的含量，明顯地較 FOSC-B 為低 (  $P < 0.001$  )，僅有 FOSC-B 的 30~35%，而其主要的鍵結物的含量差距更明顯，只有 FOSC-B 的 26~28% ( Table 9 )。因此推測在 FOSC 中可能存有抑制 PAH-DNA 鍵結物形成之因子。

爲了確定 FOSC 在 CL-3 細胞中主要鍵結物爲何？分別將在 FOSC 中找到的九種 PAHs 標準品，各以 2  $\mu\text{M}$  處理 CL-3 細胞 24 小時後，分析其 DNA 鍵結物之形成能力。結果發現九種 PAHs 中只有 B[b]FA, B[a]P, B[a]A 以及 DB[a,h]A 會在 CL3 細胞中形成 DNA 鍵結物，而比對其層析圖譜時發現 B[b]FA 與 B[a]P 所生成 DNA 鍵結物的位置，皆與 FOSC 或 FOSC-B 相似 ( Fig. 20 )，Table 10 結果顯示 B[a]P 爲九種 PAHs 在 CL-3 細胞中所形成之 DNA 鍵結物含量最高者 ( 81.97 adducts /  $10^8$  NT )，其次爲 B[b]FA ( 29.76 adducts /  $10^8$  NT )，兩者相差約三倍。但 FOSC 中 PAHs 含量最多者爲 B[b]FA ( Table 6 )，因此初步推測 FOSC 在 CL-3 細胞中之主要鍵結物，可能以 B[a]P 或 B[b]FA 所形成之鍵結物爲最主要

，或者兩者之間有一定比例同時存在，我們進一步以 HPLC 純化其中之 DNA 鍵結物，並以 LC-MS 鑑定之。

另外將 B[a]P 在小牛胸腺與在細胞所形成之鍵結物標準品做一比較 (Fig. 20)，發現在 PEI 層析圖中只有在 CL-3 所形成的主要鍵結物與在小牛胸腺 DNA 中所形成鍵結物相同，而其餘在小牛胸腺所形成的鍵結物，在 CL-3 細胞上皆無被偵測到，顯示在細胞中代謝的酵素系統與老鼠肝臟系統的表現有所不同。

## (二) DNA 鍵結物之 HPLC 純化

CL-3 中 FOSC 所形成之主要鍵結物在 PEI 層析圖譜與 B[a]P-DNA 鍵結物以及 B[b]FA-DNA 鍵結物位置相似，因此進一步分別將此三者鍵結物自 PEI 上萃取下來，進行鍵結物之 HPLC 分析，以  $\beta$ -RAM 偵測器同步偵測，同時與 B[a]P 與 B[b]FA 標準品的 DNA 鍵結物比對，結果發現 B[a]P-DNA 鍵結物在 48 分鐘出現一主要尖峰 (Fig.21-B)，B[b]FA-DNA 鍵結物在 28 分鐘以及 50 分鐘各出現一主要尖峰 (Fig.21-A)，FOSC-B 所形成之 DNA 鍵結物亦在 48 分鐘出現一主要尖峰 (Fig.21-C)，與 B[a]P-DNA 標準鍵結物的滯留時間相同，若將 B[a]P 處理 CL-3 細胞之 2  $\mu$ gDNA 與 FOSC 處理之 8  $\mu$ gDNA 混合，在 PEI 片子展開所得之萃取液，注射入 HPLC 管柱分析，結果在 48 分鐘位置，同樣有一主要之尖峰出現 (Fig. 21-D)，因此推測 CL-3 細胞中 FOSC 所形成之最主要鍵結物可能為 B[a]P-DNA 鍵結物，而除了 48 分鐘位置有一主要之

尖峰以外，在 30 ~ 45 分鐘之間有一些未知之小尖峰出現。爲了確定是否含有 B[b]FA-DNA 鍵結物此外我們由進一步提高 HPLC 偵測 DNA 鍵結物的量，並將每一分鐘之沖提液收下後以閃爍計數器偵測之，發現 FOSC 在 CL-3 細胞中，主要鍵結物除了 BPDE-N<sup>2</sup>-dG 以外，其次爲 B[b]FA 所形成的鍵結物，由所偵測的 HPLC 位置與鍵結物放射性強度推算 FOSC 在 CL-3 細胞中產生 B[a]P 與 B[b]FA 之鍵結物的比例，結果爲 1.8 比 1 (data not shown)，爲了確定此鍵結物的比例是否正確，利用標準品 B[a]P 與 B[b]FA 分別在 CL-3 細胞中所形成鍵結物的強度分別爲 25000 與 8100 DPM/nmole 來換算 FOSC 中 B[a]P 與 B[b]FA 兩者的含量與相對比例，是否和 Table 6 中 HPLC 定量結果一致；結果爲 1 mg FOSC 中含有 0.306 nmole ( 77.112 ng ) 的 B[a]P 以及 0.532 nmol ( 134.064 ng ) 的 B[b]FA，其相對比例爲 1 比 1.7，此比例與 Table 6 一致，但 B[a]P 與 B[b]FA 含量卻只有 Table 6 中 HPLC 定量結果的 40%，推測可能爲 FOSC 中化合物爲混合狀態，之間的交互作用使 B[a]P 與 B[b]FA 對 DNA 鍵結能力比單獨處理時還低。由於本實驗室過去研究發現 B[a]P 在 CL-3 細胞中之主要 DNA 鍵結物之 PEI 色層分析圖譜以及 HPLC 分析結果皆與標準品 BPDE-N<sup>2</sup>-dG ( 此標準品由美國國家毒理學研究中心生化系符必成博士提供 ) 相似 (Lee and Chen., unpublished data, 1996)。因此推測 FOSC 在 CL-3 細胞中之主要鍵結物爲 BPDE-N<sup>2</sup>-dG。爲進一步確定其存在，我們以 LC-MS 之確定此 DNA 鍵結物的質譜。

### (三) 以 LC-MS 鑑定 DNA 鍵結物

將 0.5 mg FOSC 處理 CL-3 細胞 24 小時後的 DNA 進行 nuclease P1 與 alkaline phosphatase 水解，並以 0.2  $\mu\text{m}$  濾膜過濾此樣品以進行 LC-MS 之分析，其流動相為： $\text{H}_2\text{O}/\text{acetone}=1/1$ ，0.1 % formic acid 流速為 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ 。以  $[\text{H}^3]$ -BPDE- $\text{N}^2$ -dG 為標準品，其質量為 585 m/z。而無  $\text{H}^3$  標示之 BPDE- $\text{N}^2$ -dG 之質量為 582 m/z，若 dG 之去氧核糖 (deoxyribose) 脫落，只剩 BPDE- $\text{N}^2$ -guanine，則其質量為 466 m/z，以上質量尖峰在 FOSC 處理 CL-3 細胞中皆被發現 (Fig. 22)，證實 FOSC 在人類肺腺癌 CL-3 細胞中的主要 DNA 鍵結物為 BPDE- $\text{N}^2$ -dG。

若攻擊在 dA 上，推算 BPDE-dA，m/z=567，若 dA 的 deoxyribose 脫落，只剩 BPDE-dA 時，m/z 為 451，結果在 FOSC 處理 CL-3 細胞的 LC-MS 質譜上，也有發現 567 m/z 與 451 m/z，因此推測可能在 FOSC 處理的 CL-3 細胞中，可能也有 BPDE-dA 鍵結物存在。此外 409 m/z 推測可能為 nitro-naphthol- $\text{N}^2$ -dG。

B[a]P 的致突變性和致癌性是多環芳香烴中研究最清楚的，已知 B[a]P 是一種典型的強致癌物，除了對沙門氏桿菌會表現致突變性外，對 *E. coli* 也會引起基因毒性。將人類白血球細胞以 100  $\mu\text{M}$  B[a]P 處理，在外加酵素活化下，可產生 1.3 adducts /  $10^8$  NT (Roggeband *et al.*, 1993)，同樣地 Gupta *et al.*, (1988) 以 30  $\mu\text{g}$  B[a]P 處理，就會生成 2.6 - 48.0 adducts /  $10^8$  NT，其中都具有相同的 BPDE-dG 鍵結物。

B[a]P 有許多代謝路徑，其中主要是經由 cytochrome P450 IA1 酵素系統代謝活化先生成 (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene，然後再繼續氧化形成 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-

tetrahydrobenzo[a]-pyrene (BPDE) 最終代謝物，它會直接攻擊 DNA，因此具有致突變性和致癌性。而代謝物主要攻擊 DNA 的 dG 之 N<sup>2</sup> 位置 (Jeffrey *et al.*, 1976, 1977)。另一個主要代謝路徑是單電子氧化 B[a]P，而產生 radical cation，它就會攻擊 DNA 的 deoxyguanosine 之 N<sup>7</sup> 胺基的位置，而形成 DNA 鍵結物 (Cavalieri and Rogan, 1992)。

在動物實驗上，B[a]P 會引起小老鼠的皮膚癌、胃癌、胃腫瘤及白血病 (Culp and Beland, 1994)。將倉鼠和大白鼠之氣管分離後曝露於 B[a]P 中或以氣管插管法處理倉鼠，結果發現形成的 DNA 鍵結物主要都是 dG-(+)-BPDE (Wolterbeek *et al.*, 1993; Roggeband *et al.*, 1994)。以焦煤爐排放物處理老鼠 24 小時，會在肺臟及心臟測到 B[a]P 的鍵結物，含量分別為 16.3 及 12.9 adducts /10<sup>9</sup> NT，此外，牛皮癬病患每天以含有 10 mg B[a]P 的瀝青治療，在其白血球中，可測到 7.7 adducts /10<sup>8</sup> NT。Harris *et al.* (1991) 也發現 B[a]P 會造成 ras 原致癌基因 (protooncogene) 之第 12 密碼 (codon) 發生 G → T transversion。Mass *et al.* (1993) 更利用 A/J mice 進行 B[a]P 對肺癌生成的動物實驗，結果在 B[a]P 所形成腫瘤的組織中發現 B[a]P 的 DNA 鍵結物以及 Ki-ras oncogene 的突變。Cherpillod and Amstad (1995) 的研究結果顯示 B[a]P 會造成 p53 抑癌基因之第 248 及 249 密碼發生 G → T transversion。最近，Denissenko, *et al.*, (1996) 也發現 BPDE 會攻擊 p53 gene 上 dG 的位置，而形成鍵結物，以 exon 上 condons 157, 248 和 273 三個 hot spots 之 dG 的機率最高。這些結果都證實 B[a]P 會引起人類和動物細胞的基因發生突變，甚至可能引起肺癌。

除此之外，DB[a,h]P 和 DB[a,h]A 也具有非常強的致癌性 (Richard

*et al.*, 1990)。爲了證實多環芳香煙的致癌性，將多環芳香煙塗抹在老鼠的皮膚上，以觀察動物是否會發生腫瘤，結果顯示有些多環芳香煙，例如 B[a]A, B[a]P 和 DB[a,h]A 都會引起動物的皮膚產生腫瘤 (Verschueren, 1983; IARC, 1983)。有些多環芳香煙如 B[e]P, DB[a,c]A 只能表現較弱的致癌性 (Pahlman *et al.*, 1987)。Hughes *et al.* (1993) 以 1.0  $\mu\text{mol}$  的 B[g,h,i]P 處理雄性小白鼠，結果發現 B[g,h,i]P 會與 DNA 結合形成鍵結物，因此認爲 B[g,h,i]P 可能是一種弱的腫瘤起始劑 (tumor initiator)。

Mumford *et al.*, (1987) 以及 Chuang *et al.*, (1992) 研究中國大陸雲南及貴州地區婦女罹患肺癌的原因，發現與燃燒濕煤有關；他們以 HPLC 純化分析燃燒煤球產生的煙塵之主要致突變區中含有高量的 B[a]A 和 chrysene，因此推測這些多環芳香煙可能是引起中國婦女罹患肺癌之原因。

此外，也必須特別注意煎魚油煙中含量最多的 PAH，B[b]FA。B[b]FA 已被認爲爲一致癌物質 (Habs. *et al.*, 1980)，爲另一個重要的腫瘤起始劑 (tumor initiator) (LaVoie, *et al.*, 1982; Weyand. *et al.*, 1990)，除了本實驗以外，也有報告指出在燒烤的食物油煙中亦可偵測到 B[b]FA (IARC, 1983)，B[b]FA 和 B[a]P 一樣皆有 bay-region 以提供 cytochrome P-450 I family 代謝活化成 dihydrodiol epoxide，具有攻擊 DNA 的能力 (Roggeband *et al.*, 1993)。而 B[b]FA 在老鼠肺中主要形成的鍵結物已被證實爲 trans-9,10-dihydroxy-anti-11,12-epoxy-5-hydroxy-9,10,11,12-tetra-hydro-B[b]F-deoxyquanosine (Ross, *et al.*, 1992; Mass, *et al.*, 1996)，其在 PEI-plate 的層析圖譜中所形成的位置，與本實驗中 B[b]FA 在臺灣腺肺癌 CL-3 細胞中所形成鍵結物的位置相似，因此推測

煎魚油煙之萃取液在台灣肺腺癌細胞所形成第二主要鍵結物可能為 trans-9,10-dihydroxy-anti-11,12-epoxy-5-hydroxy-9,10,11,12-tetra-hydro-B[b]F-dG。

在動物實驗上，B[b]FA 會引起小老鼠的皮膚腫瘤、肝腫瘤、肺表皮癌以及肺腺腫瘤等 (Geddie, *et al.*, 1987; LaVoie, *et al.*, 1982; 1987; Weyand, *et al.*, 1990; Deutsch, *et al.*, 1983; Mass, *et al.*, 1996)。Weyand, *et al.*, (1993) 在老鼠皮膚偵測到B[b]FA-DNA 鍵結物。Ross, *et al.*, (1992) 餵食老鼠B[b]FA，除了可偵測到B[b]FA 鍵結物的形成，亦有發現染色體交換現象。最近 Mass, *et al.*, (1996)，以 A/J mice 進行B[b]FA 之肺腫瘤形成的動物實驗，發現給予B[b]FA，8 個月後，會引發明顯的肺腺腫瘤 (Lung adenomas)，形成的數目與B[b]FA 呈線性濃度關係。而B[b]FA-DNA 鍵結物在注射後第 5 天達到最高量，並進一步發現 86 % 的腫瘤中，在 Ki-ras codon 12 發生突變，且以 G → T transversion 為最主要 (66 %)。

## 五、雌性激素在肺腺癌細胞 CL-3 中對油煙形成 DNA 鍵結物的影響

本實驗室過去研究發現在台灣女性不吸菸肺癌病患的肺組織中，DNA 鍵結物的含量較台灣男性不吸菸肺癌病患高 (Lee and Chen 1996., unpublished data)。可能與女性對環境致癌物的敏感性較高有關 (Ryberg



*et al.*, 1994)。因此本實驗想了解在雌性激素(17 $\beta$ -estradiol)存在之下，油煙萃取物對肺腺癌 CL-3 細胞形成鍵結物的能力是否有影響？由於雌性激素在女性體內會隨著不同生理期而有不同濃度表現；濾泡期為 0.01 ~ 0.09 ng/ml，中期為 0.1 ~ 0.5 ng/ml，黃體期為 0.05 ~ 0.24 ng/ml。因此選擇此三個時期濃度之中間值(0.05, 0.15, 0.3 ng/ml)，作為處理 CL-3 細胞之濃度。結果如 Table 11 所示，雌性激素對 1 mg FOOSC 在細胞中產生 PAHs 鍵結物具有促進作用，且隨雌性激素濃度(0.05 ~ 0.3 ng/ml)增加，促進作用愈明顯(129.61 ~ 240.33%)。而雌性素對 2  $\mu$ M B[b]FA 亦有促進作用(126.27 ~ 160.67%)，但較不明顯。而對 2  $\mu$ M B[a]P 在細胞中產生鍵結物之促進作用只發生在 0.05 與 0.15 ng/ml 兩個濃度，但在高濃度(0.3 ng/ml)卻有抑制作用(Table 11)。因此在本實驗發現雌性激素在肺腺癌 CL-3 細胞中，對油煙所形成 PAHs 鍵結物具有促進作用，較 B[a]P 或 B[b]FA 處理者影響還要顯著(Table 11)。

過去許多學者以不同的致癌物做動物致癌性研究，有時會發現不同性別在不同器官會有不同的致癌性反應(Guo *et al.*, 1990; Zu and Schut, 1991)。有的學者認為是不同性別之器官中有不同程度的代謝酵素及活性(Zu and Schut, 1991)。因此代謝活化產生最終代謝活化物的能力不同，而造成致癌性不同。但有的學者則發現性激素對致癌物引起 DNA 的傷害有不同的影響。例如僅會引起雌性老鼠發生肝癌的致癌物 —  $\beta$ -blocker DL-1-(2-nitro-3-methyl-phenoxy)-3-tert-butylamino-propan-2-ol (DL-ZAMI 1305)，若將雌鼠除去卵巢或注射雄性激素 testosterone 一星期，則此致癌物所引起的 DNA 傷害會完全消除。相反的，若將雄鼠進行睪丸摘除手術後，再給予雌性激素 17 $\beta$ -estradiol，則 DL-ZAMI 1305 所

造成的肝臟 DNA 傷害程度與雌鼠相似 ( Ragnotti *et al.*, 1987 )。由此可知性別不同所造成之生物反應不同，和性激素不同有關，其作用機轉可能是性激素會調控微粒體混合功能氧化酵素 (microsomal mixed function oxidase system ) 的活性，而改變致癌物的代謝活化。Han 和 Liehr (1994) 發現長期皮下注射給予雄性 Syrian 倉鼠雌性激素會引起腎臟癌，這是由於雌性激素和其衍生物間會進行 redox cycling 造成 DNA 單股斷裂 ( single-strand breaks ) 之傷害。同樣的 estrogen 刺激造成 VP-16 誘發 DNA 斷裂之現象也被發現於人類乳癌細胞中 ( Epstein *et al.*, 1988 )。

若將 B[a]P 直接塗抹於母鼠或公鼠的皮膚上，處理一段時間後，發現母鼠皮膚上 DNA 鍵結物的形成量較公鼠高 ( Baer-Dubowska and Alexandrov, 1981; Alexandrov *et al.*, 1983; Rojas *et al.*, 1986 )。綜合本實驗結果與過去之研究，顯示中式調理食品所形成之油煙在女性肺癌發生上的可能扮演重要的角色。

## 六、FOSC 對肺腺癌 CL-3 細胞之內生性基因傷害

本實驗室之前研究發現，肺組織中的多環芳香煙 ( polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs ) 之 DNA 鍵結物，在女性肺癌病患的含量並不低於男性，但是所有的女性病患都沒有抽菸，而男性病患卻絕大多數均有抽菸。因此可推測女性肺癌病患肺組織中 PAHs-DNA 鍵結物的來源可能有特殊的環境污染物，或是女性對環境污染物的敏感性較高。最近有學者報告女性肺癌病人對每包香菸所引起的 aromatic/ hydrophobic

DNA adducts 的含量遠較男性病人為高，也就是說女性對香菸所造成的 DNA 損傷之敏感度較男性為強 ( Ryberg *et al.*, 1994 )。而臺灣地區女性又大多不抽煙，因此除了要注意台灣女性的特殊環境污染源—油煙本身所引起的 DNA 鍵結物之外，還須要了解油煙是否會誘發內生性的 DNA 傷害。因此以肺腺癌 CL-3 細胞進行油煙萃取物之內生性基因傷害的研究。

### (一) 油煙萃取物對 xanthine oxidase 活性的影響

由於 xanthine oxidase 是細胞內生成游離基的主要酵素，若欲了解經過油煙處理的肺細胞是否會生成游離基，由此酵素活性的分析可推知是否有改變。因此以不同濃度之 FOSC ( 0 ~ 0.5 mg ) 處理時，利用 xanthine 作為受質測 xanthine oxidase 酵素作用下終產物 ( urate ) 之 290 nm 吸光值變化，而分析 FOSC 對 xanthine oxidase 酵素活性的影響，結果發現 FOSC 對此酵素活性具有明顯的線性濃度效應關係 ( Fig. 23;  $P < 0.01$  )，0.01 mg 到 0.5 mg 之 FOSC 對 xanthine oxidase 活性較控制組增加 7 到 246 倍。因此推測油煙可能會藉增加 xanthine oxidase 的活性，而使細胞內生成游離基，而提高氧化性壓力 ( oxidative stress )。

xanthine oxidase 活性的增加，不但會使 hypoxanthine 氧化成 xanthine，最後氧化成 urate 的能力增強，同時 xanthine oxidase 也會氧化其他物質，如 acetaldehyde，nitro-PAH 類，皆會使細胞內發生 redox cycling 而產生 ROS。0.5 mg FOSC 對 xanthine oxidase 的活性增加到 246

倍，推測可能因 FOSC 中含有 nitro-PAH 所造成。

## (二) FOSC 之 TBA 分析

由於過氧化作用發生時，所產生之 malondialdehyde (MDA) 會與 thiobarbituric acid(TBA) 形成粉紅色化合物，可由紫外線光譜儀 532 nm 波長吸光值定量。爲了瞭解 FOSC 是否會造成過氧化反應，乃進行 TBA 分析。首先將 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FOSC, FOSC-B, B[a]P, B[b]FA, FA 和 Mixed PAHs 等各種樣品分別以不同濃度與小牛胸腺 DNA 於 37 °C 作用一小時後，進行 TBA assay，其中 Mixed PAHs 爲 B[b]FA, pyrene, FA, B[g,h,i]P 和 B[a]P 等依 FOSC 之 PAHs 含量比例混合 (Table 6)，相當於 0.5 ~ 10.0 mg 的 FOSC 含量。分析結果如 Table 12 所示，只有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (P<0.05), FOSC (P<0.01) 與 FOSC-B (P<0.02) 具有統計上線性濃度效應關係，而 B[a]P, B[b]FA, FA 和 Mixed PAHs 等 PAHs 標準品皆無線性濃度效應關係。將不同濃度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 0.2 mM ascorbate 同時處理小牛胸腺 DNA，結果 0.5mM ~ 10.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所造成之過氧化的 A532 值，較控制組增加約 9.7~20.9 倍。當在 S9 酵素系統存在時，0.05 mg ~ 1.0 mg FOSC 之 A532 的值較控制組高 2.3 倍 ~ 5.4 倍，若無 S9 酵素系統存在時，0.05 mg ~ 1.0 mg FOSC 之 A532 的值增加約 2.1 倍 ~ 10.8 倍。特別值得注意的是，當 FOSC 的濃度只有 0.05 或 0.1 mg 時，S9 混合液無論存在與否，其 A532 值增加之倍數皆很接近 (2.1 ~ 2.4 倍)，但在 0.5 與 1.0 mg 時，無 S9 混合液共同處理之 FOSC 所增加之倍數 (6.2 ~ 10.8) 顯然比 S9 混合液共同處理之 FOSC 的 A532 值所增加之倍數 (3.3 ~ 5.4) 還大。爲了比

較  $\text{Cu}^{2+}$  對 MDA 生成的影響，產生 MDA 能力在不添加  $100\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  之 FOSC 組較添加  $\text{Cu}^{2+}$  組稍微減弱 12% (Table 12-1)。在 S9 酵素系統存在時， $0.05 \sim 1.0 \text{ mg}$  FOSC-B 之 A532 值增加  $1.9 \sim 3.9$  倍，顯然較 FOSC 的 A532 值所增加之能力低。而 B[a]P, B[b]FA, FA, 等各種 PAHs 在  $0.1 \sim 100 \mu\text{M}$  濃度，所產生之 A532 值均在 2.2 倍左右，而 Mixed PAHs 則維持在 1.5 倍附近 (Table 12-2)。

爲了了解 FOSC 是否在人類肺腺癌 CL-3 細胞中，也會形成過氧化反應，我們同樣以 TBA 方法分析。結果 FOSC 具有線性濃度效應關係 ( $1.3 \sim 6.7$  倍) (Table 13)。

ROS 中活性最強的氫氧自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 會造成 DNA 的 deoxyribose 發生 degradation 而生成 MDA，因此可用 TBA assay 來偵測氫氧自由基產生的程度 (Biaglow, *et al.*, 1997)。由 Table 12 的結果顯示 FOSC 在酵素活化過程中可能會產生氫氧自由基，且有線性濃度效應關係 ( $p < 0.01$ )，而 B[a]P, B[b]FA 以及 Mixed PAHs 無論濃度高低，其值都只有控制組的 2 倍，因此推測 PAH 在酵素活化過程中，不會產生活性強的氫氧自由基而可能產生活性較弱的自由基，如 quinone 類的 PAH 代謝物。由於脂質爲細胞膜及胞器膜中重要的結構成分，當細胞中有 ROS 產生時，會造成脂質過氧化反應 (lipid peroxidation)，可偵測此反應的初期產物，LHPs (Wang and Liehr, 1995 a,b) 與終產物 MDA (Wong *et al.*, 1987; Lepage *et al.*, 1991) 的產生，並加以定量以評估氧化性傷害的程度。因此同時利用兩個 MDA 生成機制不同的系統進行 TBA assay，不僅確定 FOSC 會促使細胞發生脂質過氧化而產生 MDA，亦顯示 FOSC 活化過程中有氫氧自由基的生成，且皆有線性濃度效應關係。

### (三) FOSC 造成內生性 MDA 鍵結物之研究

由以上實驗結果確定 FOSC 會促使細胞發生過氧化反應而產生 MDA，且 MDA 生成的量和 FOSC 呈線性濃度效應關係 (Table 13)，但 FOSC 誘發細胞產生的脂質過氧化產物 MDA，是否會造成內生性的 DNA 傷害？因此進行 MDA-DNA 鍵結物的研究分析。

#### 1. MDA-DNA 鍵結物標準品之合成與分析

爲了製備 MDA-DNA 鍵結物，我們分別以 dGTP、dATP、dCTP 和小牛胸腺 DNA 與 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) 進行反應，其反應條件依照過去所述 (Vaca. *et al.*, 1992)。爲了確定此鍵結物在 PEI 片上層析圖的位置，因此與未處理的 dGTP、dATP、dCTP 以及小牛胸腺 DNA 一起進行  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分析。結果如 Fig. 24 所示，所合成的 MDA-dGTP 鍵結物位於 PEI 圖譜的右上方，而且其他三組 (dATP、dCTP 以及小牛胸腺 DNA) 合成 MDA-DNA 鍵結物位置皆與 Vaca. *et al.* (1995) 所發表的 MDA-DNA 鍵結物之 PEI 層析圖譜中的位置相似。MDA-DNA 鍵結物之定量結果，顯示三種游離 nucleotides 和小牛胸腺 DNA 中，以 dGTP 所合成的 MDA-dGTP 鍵結物最高 (866.52 adducts/ $10^8$  NT) (Table 14)。因此三種 nucleotides 以 dGTP 最易形成 MDA 鍵結物，與過去一些學者的發現一致 (Basu, *et al.*, 1988; Vaca *et*

al., 1992; 1995; Chaudhary, *et al.*, 1994; 1996)。

## 2. 細胞中 MDA-DNA 鍵結物之分析

爲了確定 FOSC 所誘發 CL-3 細胞產生的脂質過氧化產物 MDA 是否會造成細胞內生性的 DNA 傷害，以 0.5 mg FOSC 在 0.1 mM Cu<sup>2+</sup> 存在下，分別處理 CL-3 細胞 0.5 ~ 24 小時，以 <sup>32</sup>P-postlabeling 分析 MDA-DNA 鍵結物是否生成？同時以 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理細胞 1 小時以及 MDA-dG 標準品作爲正控制組。結果在 PEI 之層析圖譜上 0.5 ~ 24 小時皆有發現和標準品 MDA-dGTP 相似位置之鍵結物 (Fig. 25)。定量分析的結果如 Table 15 所示，當處理 0.5 小時之 FOSC 會產生 8.08 adducts/10<sup>8</sup> NT 之 MDA-DNA 鍵結物，而處理 2 小時，即達到最高產量 (15.8 adducts/10<sup>8</sup> NT)，之後即使處理到 24 小時，也都維持在同樣 MDA-DNA 鍵結物之形成量。

## 3. 以 LC-MS 鑑定 MDA-DNA 鍵結物

爲了確定 FOSC 在 CL-3 細胞產生的 MDA-DNA 鍵結物之質量，將 0.5 mg FOSC 處理 CL-3 細胞所得之 DNA 進行 nuclease P1 與 alkaline phosphatase 水解，並以 0.2 μm 濾膜過濾此樣品以進行 MDA-DNA 鍵結物之 LC-MS 之分析鑑定，其流動相爲：H<sub>2</sub>O/acetone = 1/1，流速爲 10

$\mu\text{l}/\text{min}$ 。並以合成之MDA-dG作為標準品；由於不帶磷酸根之MDA-1-N<sup>2</sup>-dG質量為301 m/z，若去氧核糖(deoxyribose)自dG上脫落後，成為187 m/z之MDA-1-N<sup>2</sup>-guanine，結果在處理過FOSC之CL-3細胞中確實在LC-MS質譜上發現這兩種質量的尖峰(Fig.26)，因此證實處理FOSC的CL-3細胞，確實會發生脂質過氧化反應產生MDA，進而攻擊細胞DNA，形成MDA-1-N<sup>2</sup>-dG鍵結物。其形成量和FOSC的處理濃度，呈線性濃度效應關係，因此，FOSC會引發人類肺癌細胞產生內生性的DNA傷害。

脂質過氧化之終產物-MDA，本身是一種致突變物或致癌物，在體外會與deoxynucleosides產生多種鍵結物，在pH中性時所產生之主要鍵結物是M1G-deoxyribose(Marnett *et al.*, 1986)，它會引起G→T transversion突變。在健康的人類肝組織中發現有MDA-DNA鍵結物，其平均含量為9 adducts/10<sup>7</sup> NT，相當於一個細胞中有5400個鍵結物。這項發現提出一有利證據說明健康的人體內會繼續不斷的進行脂質過氧化，而產生內生性的DNA傷害。同時已知多環芳香烴類化合物在金屬離子存在下會生成 $\cdot\text{O}_2^-$ (Sullivan, 1985; Lilienblum *et al.*, 1985)，引起脂質過氧化作用而產生MDA，進而增加內生性DNA的傷害。Vaca *et al.*, (1995)以<sup>32</sup>P-postlabeling方法偵測正常人總白血球以及女性乳房組織中MDA-DNA的鍵結物，發現前者平均為2.6 adducts/10<sup>7</sup> NT，後者為3.0 adducts/10<sup>7</sup> NT。由以上研究結果顯示人體內可能一直有redox cycling在進行，而使組織中存在一定的MDA量。與Chaudhary(1994)在肝組織中所偵測的量比較，顯示在肝組織中MDA-DNA的鍵結物比在血球以及乳房組織中高，可能與組織接受外來物的含量，而進行代謝活



化所產生的自由基有關，同時因肺組織時常暴露外來物質，如油煙、香煙、汽機車排放物等，因此更容易誘發 redox cycling 而產生自由基，造成脂質過氧化產生 MDA 去攻擊 DNA 形成 MDA-DNA 的鍵結物。Benamira *et al.*, (1995) 利用 M13 DNA 與 MDA 形成鍵結物轉移入 *E. coli* 中，造成 16% 移位突變 (frameshift mutation) 與 76% 鹼基更換突變 (base-pair substitution)，而鹼基更換突變中 43% 為 transversion，以 G→T 為主，57% 為 transition，以 C→T，A→G 為最主要。因此，由以上的結果得知油煙所誘發的 DNA 氧化性傷害，可對肺癌的形成提供一些線索。

#### (四) FOSC 造成單股 DNA 斷裂和 8-OH-dG 之形成分析

當體內因 redox cycling 而生成 reactive oxygen radical (ROS)，常會造成 DNA 氧化性傷害。ROS 可能直接攻擊 DNA 之雙股螺旋結構，而造成 DNA 單股或雙股斷裂 (single-strand or double-strand break) 傷害，也可能藉由活化某些 DNA 分解酵素，使 DNA 產生斷裂 (Cantoni *et al.*, 1989)。ROS 也會直接修飾 DNA 上的鹼基 (base modification) 而產生各種不同之氧化型鹼基，其中最常見的 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)，已成為 DNA 氧化性傷害之指標化合物 (Marnett and Bucham, 1993)。為了瞭解油煙造成 DNA 氧化性傷害，我們也以 DNA 單股斷裂傷害與 8-OH dG 生成來評估 FOSC 所造成之氧化性傷害程度。

## 1. FOSC 對細胞之 DNA 單股斷裂的分析 (Nick translation assay)

由初步實驗的結果顯示，正常肺細胞株 WI-38 對 nick translation 分析的敏感性遠較 CL-3 細胞為高 (data not shown)，因此有關 FOSC 對細胞之 DNA 單股斷裂的分析，以 WI-38 細胞進行 nick translation 分析。不同濃度之 FOSC 處理正常肺細胞株 WI-38，培養 2 小時後，以 nick translation assay 偵測 DNA 單股斷裂傷害。結果發現 FOSC 對 WI-38 細胞會造成 DNA 單股斷裂傷害，當 0.1 mg FOSC 處理正常肺細胞 2 小時，DNA 單股斷裂傷害程度為控制組的 1.4 倍，1.0 mg FOSC 處理時，為控制組的 2.3 倍且具有線性濃度效應關係 (Fig. 27 ;  $P < 0.05$ )。

## 2. 8-OH dG 形成之分析

### (1) ECD/UV HPLC 之偵測

在 8-OH dG 偵測方面，同時連結 ECD 與 UV 兩種偵測器進行 HPLC 分析。首先以不同濃度 8-OH dG 標準品進行標準曲線測定與建立 (Fig. 28)，並以小牛胸腺 DNA 與 1 mM ascorbate 和 50  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  以及 250 mM phosphate buffer 所合成的 8-OH dG 作為分析與校正之標準品；8-OH dG 在 19.5 分鐘被 ECD 偵測到，而 dC、dG、dT、dA 分別在 7、

14、16.5、27.5 分鐘處被UV 偵測器偵測到。進一步分別以 ascorbate、B[a]P 以及FOOSC 之各種不同濃度 (Table 16)，與 200  $\mu\text{g}$  小牛胸腺 DNA 作用 2 小時，將水解後之 DNA 進行 8-OH dG 分析，將樣品中測得之 8-OH-dG 之波峰面積，代入標準曲線後所得實際進行偵測之樣品的 8-OH-dG 量後，進一步以小牛胸腺 DNA 在 UV 偵測器中所測得四個鹼基的面積來校正，而得  $\sim\text{fmole}/\mu\text{g}$  DNA 的量。結果發現不同濃度之 FOOSC 皆有偵測到 8-OH dG，且具有線性濃度效應關係 (Table 16;  $P < 0.05$ )；在  $\text{Cu}^{2+}$ 、S9 混合物存在下，0.05 mg  $\sim$  2.0 mg FOOSC 會產生 379.5  $\sim$  1059.8  $\text{fmole}/\mu\text{gDNA}$ 。而 B[a]P 亦有偵測到 8-OH dG，但沒有線性濃度效應關係，1  $\mu\text{M}$   $\sim$  500  $\mu\text{M}$  皆低於 40  $\text{fmole}/\mu\text{g}$  DNA (Table 16)。

## (2) 8-OH dG 之 LC-MS 定性分析

爲了確定 FOOSC 的確會造成細胞 DNA 氧化性傷害而產生 8-OH dG，因此以 0.5 mg FOOSC 處理 CL-3 細胞 24 小時以及上述處理小牛胸腺 DNA 之樣品，將萃取下來的 DNA 進行 nuclease P1 與 alkaline phosphatase 水解，並以 0.2  $\mu\text{m}$  濾膜過濾此樣品，以進行 LC-MS 之定性分析，其流動相爲： $\text{H}_2\text{O}/\text{acetone} = 1/1$ ，流速爲 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ 。並以合成之 8-OH dG 作爲標準品；由於不帶磷酸根之 8-OH dG 質量爲 284  $\text{m/z}$ ，若去氧核糖 (deoxyribose) 自 dG 上脫落後，成爲質量 165  $\text{m/z}$  之 8-OH-guanine，結果於 FOOSC 所處理之小牛胸腺 DNA 以及 CL-3 細胞上，在 LC-MS 質譜上皆可偵測到 (Fig. 29)。綜合以上研究結果證實：煎魚油煙

萃取物會促使肺腺癌 CL-3 細胞發生 DNA 氧化性傷害，而產生 8-OH dG。

Table 16 中 ascorbate 與二價金屬離子反應會生成氫氧自由基 (Halliwell, *et al.*, 1987; Biaglom, *et al.*, 1997)，而造成 8-OH-dG 的生成。綜合 Table 16 和 Table 12 的結果更確定 FOSC 所形成的自由基以氫氧自由基為最主要。DNA 的傷害在癌症生成的各個時期都有發生，而任何致癌物都有可能會修飾 DNA (Halliwall, *et al.*, 1987)，而內生性或外生性各種機制生成的含氧自由基會修飾細胞中的組成成分，包括 DNA、nucleoprotein (Halliwall, *et al.*, 1991)，其中以氫氧自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 為最主要，可以直接地與 DNA 結合、反應，而產生毒性作用 (Gille, *et al.*, 1996) 包括 base modification, sugars modification, strand break 以及 DNA-protein cross-links 等 (Halliwall, *et al.*, 1991; VonSonntag, 1987; Oleinick, 1987; Dizdaroglu, 1992)。而活性極低的  $\text{H}_2\text{O}_2$  與  $\cdot\text{O}_2^-$  等物質，對 DNA 具有極低的活性甚至不具活性，但在過渡金屬離子存在，可藉由“Haber-Weiss”反應產生  $\cdot\text{OH}$  而產生間接的毒性作用。若體內調控重要生理功能的基因發生氧化性傷害，可能造成不同層次的影響，其重要性遠超過其分子之過氧化作用。其作用型態為：(1) 直接修飾 DNA 上的鹼基，使得 DNA polymerase 判讀上產生錯誤 (misreading)。(2) 作用在其他的轉錄因子上，使轉錄工作受到影響。(3) 作用在某些負責調控基因表現或修補基因的酵素上，而間接造成 DNA 的傷害。自由基所造成 DNA 氧化性傷害，除了以 MDA-DNA 鍵結物作為指標外，最廣泛地以 8-OH dG 作為被測試與研究的對象 (Shen *et al.*, 1989; 1995)。Jaruga, *et al.*, (1992; 1994) 偵測人類肺癌組織和其周圍無腫瘤組織中的修飾鹼基

以及 SOD, catalase 和 glutathione peroxidase 活性, 其中有 12 種修飾鹼基被偵測到, 並發現腫瘤組織中有 DNA 傷害的增加和抗氧化酵素活性降低的組合 ( Jaruga, *et al.*, 1994 )。因此在癌症發生上, 自由基所扮演直接或間接的角色, 都值得特別注意。Ichinose *et al.*, (1997) 以柴油廢氣懸浮粒進行小白鼠動物實驗, 發現 8-OH dG 的生成量與腫瘤的發生率呈正相關性, 而 FOSC 會引發活性強的氫氧自由基產生, 而造成 MDA-DNA 鍵結物與鹼基修飾的產生, 對肺癌發生的影響或許與 PAHs 所形成的 bulky-adduct 同時扮演著 initiator 的角色外, 自由基也扮演著 promoter 的角色。

#### (五) FOSC 產生氧化性傷害與 PAH-DNA 鍵結物之相關性

由以上之研究, 證實 FOSC 在 CL-3 細胞中, 會造成 DNA 傷害可能來自兩個方面: 一方面為會因 FOSC 中所含的 PAHs 基因毒物形成 DNA 鍵結物, 主要以 B[a]P 所造成的 BPDE-N<sup>2</sup>-dG 鍵結物為最主要, 另一方面同時會誘發細胞發生內生性的 DNA 傷害, 而造成 MDA-DNA 鍵結物與 8-OH dG 的生成。為了進一步了解 FOSC 在 CL-3 細胞中形成此兩種不同的 DNA 傷害是否相關, 而進行以下的實驗。

#### 1. 自由基清除劑 ( radical scavenger ) ascorbate 與 PAH-DNA 鍵結物之形成關係

自由基的產生在 PAH-DNA 鍵結物的形成過程中，是否扮演重要的角色？因此參照 Randerath *et.al.*, (1992) 的方法利用不同濃度 (5 ~ 200 mM) 的 ascorbate 和 100 mM DTT 做為自由基清除劑分別與 0.5 mg FOSC 以及 0.2  $\mu$ M B[a]P 共同處理 CL-3 細胞 24 小時後，進行 PAH-DNA 鍵結物的  $^{32}$ P-postlabeling 分析，結果不同濃度的 ascorbate 對 FOSC 以及 B[a]P 所造成的鍵結物，皆有明顯的抑制作用 (Table 17)；對 FOSC 所造成的 PAH-DNA 鍵結物，抑制 80% 以上，而對 B[a]P 所造成的鍵結物，抑制約 98%。另外，值得注意的是以 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分別和 FOSC 以及 B[a]P 共同處理 CL-3 細胞 24 小時後，對 CL-3 細胞產生細胞毒性，大約有一半的細胞死亡 (經由光學顯微鏡的觀察)，因此對 FOSC 以及 B[a]P 所造成的鍵結物形成之抑制作用，可能是經由細胞毒性所致 (Table 17)。

## 2. 自由基與 DNA 鍵結物之關係

為了進一步了解 FOSC 產生 PAHs-DNA 鍵結物是否與自由基之生成有所關連，因此在 S9 混合液存在，同時添加 50  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>，以不同濃度 (0.05 ~ 2.0 mg) 之 FOSC 與 200  $\mu$ g 小牛胸腺 DNA 作用 2 小時後，分別進行 PAHs-DNA 鍵結物的  $^{32}$ P-postlabeling 分析和 8-OH dG 生成之分析，結果如 Fig.30 顯示在 0.05 mg 到 2 mg 之 FOSC 所造成的 PAHs-DNA 鍵結物與所生成的 8-OH dG 的量，不但兩者分別具有濃度效應關

係，且兩者之間，在統計上亦有顯著性相關 ( $r=0.8604$ ;  $P<0.05$ )。

### 3. MDA-DNA 鍵結物與 PAHs-DNA 鍵結物之關係

爲了瞭解 FOSC 使 CL-3 細胞中產生 PAHs-DNA 鍵結物與發生內生性傷害而產生的 MDA-DNA 鍵結物，此兩種之間有何相關？因此以 0.5 mg FOSC 分別處理 CL-3 細胞 0.5 ~ 24 小時後，分別進行 MDA-DNA 鍵結物與 PAHs-DNA 鍵結物的分析 (Fig. 31)，結果發現 MDA-DNA 鍵結物，在 2 小時即達到最高量 (15.75 個/ $10^8$ NT)，之後一直維持在此 DNA 鍵結物含量。而 PAHs-DNA 鍵結物在前 10 小時之內，皆維持在低生成量 (4 ~ 8 adducts/ $10^8$ NT)，但到了 10 小時即開始逐漸增加，直到 16 小時達到最高量 57.14 adducts/ $10^8$ NT (Fig. 31)。由此結果顯示 FOSC 所造成之 DNA 之氧化性傷害較油煙中之基因毒物所造之 DNA 傷害爲迅速。這可能是代謝活化油煙中 PAHs 成份的基因表現可能要靠氧化性傷害之細胞訊號啓動。其間的真正機轉，仍須進一步釐清。

Randerath, *et al.*, (1992) 以 ascorbate 和 DTT 作爲自由基清除劑，共同與香煙萃取液一起處理 DNA 以探討自由基對 PAH-DNA 鍵結物形成所扮演的角色。和本實驗得到相同結果：皆對 PAH-DNA 鍵結物的形成有抑制作用 (Table 17)。因此推測自由基對油煙中 PAH-DNA 鍵結物的形成，可能也扮演重要的輔助角色。可由下列三點解釋：(I) PAHs 在酵素代謝活化過程中會進行 redox cycling 反應而產生自由基，直接攻擊 DNA 而產生鍵結物。(II) 在 DNA 上提供一個 radical site 使 PAHs

代謝物可以更穩定與DNA 結合。(III) 使PAHs 代謝物成爲易與DNA 反應的親電性物質 (Randerath,*et al.*, 1992)。因此隨著 FOSC 濃度增加, 8-OH dG 和 PAH-DNA 鍵結物都會成相關性地增加 (Fig.30)。Park, *et al.*, (1996), 最近發現經由 Ah 接受器所誘發 cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) 的產生與DNA 氧化性傷害有正相關。他們利用 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) 和 indolo(3,2-b)carbazole (ICZ) 誘使 Hepalcl7 細胞中 CYP 1A1 酵素的表現而造成培養液中 8-OH guanine 的增加 (爲 8-OH dG 被修補後的產物)。當加入 CYP1A1 的抑制劑時發現 8-OH guanine 明顯的下降。已知肺腺癌 CL-3 細胞中, 主要代謝活化 PAHs 的酵素爲 CYP1A1, 因此 Fig. 30 之結果推測 FOSC 中所含 PAHs 可被細胞中 CYP1A1 所代謝, 同時造成 PAH-DNA 鍵結物的生成以及 DNA 氧化性傷害的產生, 而且所生成的 MDA-dG 鍵結物之含量和 DNA 受到氧化游離基傷害所生成 8-OH dG 的含量是有相關性的 (Chaudhary, *et al.*, 1994), 因此由 Fig.31 的結果亦可說明在前 10 個小時之內對細胞主要之傷害爲 FOSC 所誘發的氧化性傷害, 包括 8-OH dG 以及 MDA-DNA 鍵結物的生成, 而 10 小時之後 PAH-DNA 鍵結物的量逐漸增加, 而氧化性 DNA 傷害仍一直存在。Weitzmar, *et al.*, (1985), 在體外實驗中利用 B[a]P 誘導基因突變後加入活化的中性球 (neutrophile) 或是 xanthine oxidase, 使之產生大量 ROS 之後, 可以發現轉形細胞數目的增加, 而推測氧化性傷害在癌化的促進期亦扮演一個重要的角色。

#### (六) FOSC 對肺腺癌 CL-3 細胞中 p53 蛋白表現的影響



過去的研究發現 p53 蛋白與細胞生長的調控有關。DNA 受到傷害會使 p53 蛋白表現增加 (Kastan *et al.*, 1991) 而引起一些參與調控細胞生長之基因活化，使得細胞週期停止於 G1 checkpoint，而無法進入 S 期進行 DNA 的複製 (Dutta *et al.*, 1993)，使細胞有足夠的時間來修補受傷的 DNA，或使細胞走向凋亡 (apoptosis) 之途 (Wu and Levine 1994)。若 p53 基因發生突變，不但無法發揮其正常抑癌功能，反而對細胞之癌化扮演重要的角色，過去研究指出人類許多癌症都與 p53 gene 突變有密切關係，且提供癌症病原學上分子病理的指標 (Harris 1993)。因此為了探究 FOSC 對 CL-3 細胞中 p53 蛋白表現的影響，以細胞免疫染色方法 (immunocytochemistry) 進行本實驗。首先分別以不同濃度之 B[a]P、B[b]FA、FOSC 與 FOSC-B 處理 CL-3 細胞 24 小時，結果在免疫染色分析上 p53 蛋白表現的情形如 Fig. 32 與 Fig. 33 所示，並以 200 個細胞中，所偵測到的 p53 蛋白免疫染色之百分比，作為 p53 表現之定量指標，結果發現控制組中 p53 蛋白的表現約 60.5%，而隨著 B[a]P 與 B[b]FA 濃度的增加 (0.1 ~ 10  $\mu$ M)，在免疫染色分析上，偵測 p53 的表現有逐漸減少的現象 (B[a]P 為 97.5 ~ 22.0%，B[b]FA 為 44.5 ~ 0.0%)，尤其在高濃度 (10  $\mu$ M) 時，幾乎完全偵測不到，而在 FOSC 與 FOSC-B 中 (0.01 ~ 1 mg) 亦得相同的結果 (FOSC 為 22.5 ~ 1.0%，FOSC-B 為 45.5 ~ 10%) (Fig. 18)。另一方面，同時以不同濃度 (0.01 ~ 1.0 mg) FOSC 分別處理 CL-3 細胞 4、16、24 小時，結果在免疫染色分析上 p53 蛋白表現的情形如 Fig. 34 所示，定量結果發現在 0.01 ~ 1.0 mg FOSC 處理的細胞中 p53 蛋白的表現皆會隨著處理時間的增加而有減少之趨勢 (Table

19)，且 FOSC 處理濃度愈高，此趨勢愈明顯，如 1.0 mg FOSC 處理 4 小時，p53 蛋白表現 33%，處理 24 小時，p53 蛋白表現 1.0%。

Ames, *et al.*, (1993) 指出在正常狀況下每人每天細胞中受到氧化性攻擊的數目約有 10,000 cells/day，而這些傷害通常都會被修補系統 (repair system) 修復並移除。但若是外來因素使得 ROS 大量增加時可能修補不及而造成 DNA 傷害，因此氧化性傷害在癌症發生之啟動階段 (initiator) 扮演一個重要之角色 (Halliwell and Aruoma, 1991)，當 ROS 攻擊而造成鹼基修飾 (base modification) 時，例如會使得 DNA 產生 G → T 之改變以及 A → C 突變，而造成 GC 配對變成 TA 配對 (Cheng *et al.*, 1992)。在 ras 的活化中 (Bos 1988) 以及 p53 皆有 G → T 的突變，也導致肺癌及肝癌的發生 (Takahashi, *et al.*, 1989; Hsu. *et al.*, 1991)。此外，蛋白質分子亦是活性氧化物可能攻擊目標的被氧化分子，很可能因為構形改變 (conformation change) 而易被分解；或者難以被分解而在體內堆積。而蛋白酵素被自由基攻擊，往往會造成較嚴重的影響。一旦受到活性氧化物之攻擊，酵素結合部位或活性作用部位之構形可能因此改變，而使其正常代謝功能受到影響；另一方面，若受損的是修補酵素則不僅細胞本身受到傷害，間接的促進了遺傳毒性的產生 (Stadtman, 1992)。因此推測 Table 21 以及 Table 22 中，FOSC 對 p53 表現的影響，可能是因 (1) FOSC 對細胞的毒性使然。(2) p53 基因之 promotor site 被 FOSC 中 PAH 結合或發生 DNA 氧化性傷害而抑制 p53 的表現。(3) FOSC 造成 p53 蛋白結構改變，而使 p53 蛋白易被 degradation。(4) BPDE 與 DNA 形成鍵結物後，會造成 DNA 的構形發生改變，而影響 DNA 與 sp1 蛋白的結合 (MacLeod, *et al.*, 1995)，而 sp1 與 BPDE-DNA

鍵結物結合可能破壞基因調節，被認為與 sp1 和其他蛋白之間交互作用有關，而 p53 被 degradation 後更使細胞內的 DNA 傷害無法被修補，Treiber, *et al.*, (1994) 進一步認為藉著 sp1 在 BPDE-adduct 的結合，可能因此妨礙了 DNA 修補機制對鍵結物之辨識，而造成 adduct lifetime 的延伸。

綜合以上的研究發現油煙中對細胞 DNA 的傷害一方面來自油煙本身致癌物的代謝活化而與 DNA 結合，另一方面也會因氧化性傷害形成 MDA 鍵結物與鹼基氧化修飾，而且兩方面是互相影響甚至加強傷害之嚴重性與持久性，可能扮演者致癌過程中 initiator 與 promoter 的角色。且會因女性荷爾蒙之影響而造成更大之傷害，這些發現對油煙在女性肺癌發生之重要性提出更直接的可能證據。

## 柒、 參考文獻

- Adamson, R.H., Thorgeirsson, U.P., Snyderwine, E.G., Thorgeirsson, S.S., Reeves, J., Delgard, D.W., Takayama, S. and Sugimura, T. (1990) Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in nonhuman primates : induction of tumors in three macaques. *J. Cancer Res.*, **81**, 10-24.
- Aeschbacher, H.U. and Ruch, E. (1989) Effect of heterocyclic amines and beef extract on chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **10**, 429-433.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A.M., Petruzzelli, S., Giuntimi, C. and Bartsch, J. (1992) An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers lung: comparison with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, **52**, 6248-6253.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Bourgeois, Y. and Chouroulinkov, I. (1983) The persistence of benzo[a]pyrene diol-epoxide deoxyguanosine adduct in mouse skin and its disappearance in rat skin. *Carcinogenesis*, **4**, 1655 -1657.
- Ames, B.N., Sins, P. and Grover, P.L. (1972) Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frame-shift mutagens. *Science*, **176**, 47 -49.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922.
- Amin, S., LaVoie, E.J. and Hecht, S.S. (1982) Identification of metabolites of benzo[b]-fluouanthene. *Carcinogenesis*, **3**, 171-174.
- Aoyama, T., Gonzalez, F. and Gelboin, H.V. (1989) Mutagen activation by cDNA-expressed P1450, P3450, and P450a. *Mol. Carcinogenesis*, **1**, 253-359.
- Baer-Dubowska, W. and Alexandrov, K. (1981) The binding of benzo[a]-pyrene to mouse and rat skin DNA. *Cancer Lett.*, **13**, 47-52.
- Basu, A.K., O'Hara, S.M., Valladier, P., Stone, K., Mols, O. and Marnett, L.J. (1988) Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 53-59.
- 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.
- Beland, F.A., Heflich, R.H., Howard, P.C. and Fu, P.P. (1985) The in vitro metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons, in: R.G. Harvey (Ed.), *Polycyclic Hydrocarbons and carcinogenesis*, ACS Sump. Ser, **283**, American Chemical Society, Washington, DC, PP.371-396.
- Benamira, M., Kristin, J., Chaudhary, J., Kaylon, B., Tibbetts, C., and Marnett, L.J. (1995) Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis*, **16**.

93-99.

- Berg, I., Overvik, E. and Gustafsson, J.A. (1990) Effect of cooking time on mutagen formation in smoke, crust and pan residue from panbroiled pork. *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 421-426.
- Berg, I., Overvik, E. Nord, C.E., and Gustafsson, J.A. (1988) Mutagenic activity in smoking formed during broiling of pork at 200, 250 and 300°C. *Mutat. Res.*, **207**, 199-204.
- Biaglow, J.E., Manevich, Y., Fatih, U. and Held, K.D. (1997) Quantitation of hydroxyl radicals produced by radiation and copper-linked oxidation of ascorbate by 2-deoxy-d-ribose method. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 1129-1138.
- Bjelogrić, N.M., Makinen, M., Stenback, F. and Vahakangas, K. (1994) Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and increased p53 protein in mouse skin. *Carcinogenesis*, **15**, 771-774.
- Boffetta, P., Randall, E., Harris, E. and Wynder, E.L. (1990) Case control study on occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer risk. *Am. J. Indust. Med.*, **17**, 577-591.
- 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 mutation found when a shuttle vector containing adducts of 1,6-dinitropyrene replicates in human cells. *Carcinogenesis*, **12**, 119-126.
- Bolton, J.L., Wu, H.M. and Hu, L.Q. (1996) Mechanism of isomerization of 4-propyl-*o*-quinone to its tautomeric *p*-quinone methide. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 109-113.
- Bos, J. (1988) The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **195**, 255-271.
- Brown, J.P., Pagano, M. (1997) Mechanism of p53 degradation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1332**, 01-06.
- Brunborg, G., Holme, J.A., Alexander, J., Becher, G and Hongslo, J.K. (1988) Genotoxic activity of the N-acetylated metabolites of the mutagen 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Mutagenesis*, **3**, 303-309.
- 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.
- Cantoni, O., Sestili, P. and Cattabeni, F. (1989) Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, **2**, 209-212.
- Castro, V.M., Soderstrom, M., Carlberg, I., Widersten, M., Platz, A. and Mannervik, B. (1990) Difference among human tumor cell lines in expression of glutathione transferases and other glutathione-linked enzymes. *Carcinogenesis*, **11**, 1569-1576.
- Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G. (1992) The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmac. Ther.*, **55**, 183-190.
- Cavbaliere, E.L., Higginbotham, S., Ramakrishnan, N.V.S., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Rogan, E.G. and Salmasi, S. (1991) Comparative dose-response tumorigenicity studies of dibenzo[a]pyrene versus 7,12-dimethyl- beno[a]pyrene, benzo[a]pyrene and two

- dibenzo[*a,l*] pyrene digydrodiols in mouse skin and rat mammary gland. *Carcinogenesis*, **12**, 1939-1944.
- Cerutti, P.A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**, 375-377.
- Chaloupka, K., Harper, N., Krishnan, V., Santostefano, M., Rodriguez, L.V. and Safe, S. (1993) Synergistic activity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures as aryl hydrocarbon ( Ah ) receptor agonists. *Chem. Biol. Int.*, **89**, 141-158.
- Chang, S.K., Chang, K.T., Fang, Y.F., Lan, C.F., Hsiao, H.C., Shen, S.H. and Wei, Y.H. (1988) Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons analysis of airborne particulate matter. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC*, **12**, 129-139.
- Chaudhary, A.K., Nokubo, M., Reddy, G.R., Yeola, S.N., Morrow, J.D., Blair, I.A. and Marnett, L.J. (1994) Detection of endogenous malondialdehyde -deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, **265**: 1580-1582.
- Chaudhary, A.K., Reddy, G.R., Blair, I.A. and Marnett, L.J. (1996) Characterization of an N<sup>6</sup>-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography /electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*, **17**. 1167-1170.
- Chen, C.C. and Lee, H. (1996) Genotoxicity and DNA adduct formation of incense smoke condensates: Comparison with environmental tobacco smoke condensates. *Mutation Res.*, **367**, 105-114.
- Chen, C.J., Wu, H.Y., Chuang, Y.C., Chang, A.S., Luh, K.T., Chao, H.H., Chen, K.Y., Chen, S.G., Lai, G.M., Huang, H.H, and Lee, H.H. (1990) Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res.*, **10**, 971-976.
- Chen, P.S., Shieh, H.H. and Gaw, J.M. (1980) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates at various sites in Taipei city by GC/MS and class capillary GC. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC*, **4**, 280-284.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanosine, an abundant form of oxidative DNA damage, cause G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, **267**, 166-172.
- Cherpillod, P. and Amstad, P.A. (1995) Benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Mol. Carcinogenesis*, **13**, 15-20.
- Chou, M.C. and Lee, H. (1990) Mutagenicity of airborne particles from four cities in Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC*, **14**, 142-150.
- Chou, M.W., Heflich, R.H. and Fu, P.P. (1985) Multiple metabolic pathways for the mutagenic activation nitrobenzo[*a*]pyrene. *Carcinogenesis*, **6**, 1235-1238.
- Chuang, J.C., Wise, S.A., Cao, S. and Mumford, J.L. (1992) Chemical characterization of mutagenic fractions of particles from indoor coal combustion: a study of lung cancer Xuan Wei, China. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 999-1004.
- Clonfero, E., Granella, M., Marchioro, M., Barra, E.L., Nardini, B., Ferri, G. and Foa, V. (1995) Urinary excretion of mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, **16**, 547-554.
- Coggon, D. and Wield, E.D. (1993) Mortality of army cooks. *Scand.J. Work Environ. Health*, **19**, 85-88.
- Coggon, D, B Pannett, C. Osmond, ED Acheson (1986) A survey of cancer and occupation in young and middle aged men. I. Cancer of the respiratory tract. *Brit J Ind Med.*,

43: 332-338.

- Cole, P.R. Hoover and G.H. Friedell (1972) Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer*, **29**: 1250-1260.
- Croft, S., Gilbert, B.C. and Whitwood, A.C. (1992) An E. S. R. investigation of the reaction intermediate generated in the reaction between  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in aqueous solution. *Free Rad. Res. Commun.*, **17**, 21-39.
- Culp, S.J. and Beland, F.A. (1994) Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **15**, 247-252.
- Delclos, K.B., El-Bayoumy, K., Hechy, S. S., Walker, R.P. and Kadlubar, F.F. (1988) Metabolism of the carcinogen [ $^3\text{H}$ ]6-nitrochrysene in the preweanling mouse: identification of 6-aminochrysene 1,2-dihydrodiol as the probable proximate carcinogenic metabolite. *Carcinogenesis*, **9**, 1875-1884.
- Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S., Pfeifer, G.P. (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science*, **274**, 430-432.
- 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.
- Department of Health, Executive Yuan, Republic of China. (1993) Public Health in Taiwan Area, Republic of China.
- Deutsch Wenzel, R.P., Brune, H., Grimmer, G., Dettbarn, G. and Misfeld, J. (1983) Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl Cancer Inst.*, **71**, 539-544.
- Dipple, A., Pigott, M.A., Agarwal, S.K., Yagi, H., Sayer, J.M. and Jerina, D.M. (1987) Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature*, **327**, 535-536.
- Dickson, R.I. (1981) Nasopharyngeal carcinoma: An evaluation of 209 patients. *Laryngoscope*, **XCI**, 333-354.
- 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 Philopt RM (eds.), **10**, 1-40
- Djuric, Z., Fifer, E.K., Yamazoe, Y. and Beland, F.A. (1988) DNA binding by 1-nitropyrene and 1,6-dinitropyrene in vivo and in vitro: effects of nitroreductase induction. *Carcinogenesis*, **9**, 357-364.
- 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.
- Dreher, D. and Junod, A.F. (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development *Eur. J. Cancer*, **32**, 30-38.
- Drouin, R., Rodriguez, H., Gao, S.W., Gebreyes, Z., O'Connor, T.R., Holmquist, G.P. and Akman, S.A. (1996) Cupric ion/ascorbate/hydrogen peroxide-induced DNA damage: DNA-bound copper ion primarily induces base modifications. *Free Radical Biology & Medicine*, **21**, 261-273.

- Dubrow,R and DH Wegman (1984) Cancer and occupation in Massachusetts: A death certificate study. *Am J Int Med.*, **6**: 207-230.
- Dunn,B.P. and Stich,H.F.(1986) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in human oral mucosal cells, *Carcinogenesis*, **11**,11-15.
- Dutta,A., Ruppert,J.M., Aster,J.C. and Winchester,E.C. (1993), Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*, **365**, 79-82.
- 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.
- Epstein,R.J., Smith,P.J., Watson,J.V. and Bleehen,N.M. (1988) Characterization of VP-16-induced DNA cleavage in oestrogen-stimulated human breast cancer cells. *Br. J. Cancer*, **57**: 445-450.
- Esumi,H., Ohgaki,H., Kohzen,E., Takayama,S. and Sugimura, T. (1989) Introduction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Jpn.J. Cancer Res.*, **80**, 1176-1178.
- Everson,R.B., Randerath,E., Santella,R.M., Cefalo,R.C., Avitts,T.A. and Randerath,K. (1986) Detection of smoking-related covalent DNA adducts in human placenta. *Science*. **231**, 54-57.
- Felton,J.S., and Knize,M.G., (1994) Heterocyclic-amine mutagens/ carcinogens in foods. *Handbook of Experimental Pharmacology.*, **94**, 471-502.
- Felton,J.S., and Knize,M.G., (1991) Occurrence, identification, and potential mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. *Mutant. Res.*,**259**: 205-217.
- Felton,J. S., Knize,M.G., Shen,N.H., Andresen,B.D., Bjeldanes,L.F. and Hatch,F.T. (1986) Identification of the mutagens in cooked beef. *Environ. Health Perspect.*, **67**, 17-24.
- Flammang,T.J., Talaska,G., Chu,D.Z.J., Lang,N.P. and Kadlubar,F.F. (1988) N-Acetyltransferase polymorphism and arylamine toxicity: relationship to O-acetylation reactions, in D.J.Huston, J.Caldwell and E.D.Paulson (Eds.), "*Intermediary Xenobiotic Metabolism and Significance*" , 151-177.
- Flammang,T.J., Yamazoe,Y., Benson,R.W., Roberts,D.W., Potter,D.W., Chu,D.Z.J., Lang,N.P. and Kadlubar,F.F. (1989) Arachidonic acid-dependent peroxidative activation of carcinogenic arylamines by extrahepatic human tissue microsomes. *Cancer Res.*, **49**, 1977-1982.
- Flowers-Geary,L., Harvey,R.G. and Penning,T.M. (1995) Identification of benzo[a]pyrene-7,8-dione as an authentic metabolite of (±)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, **16**, 2707-2715.
- Floyd,R.A., West,M., Eneff,K.L., Hogsett,W., Tingey,D.T. (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**: 266-272.
- Floyd,T.A. (1990) The role of 8-hydroxyguanosine in carcinogenesis.*Carcinogenesis*, **11**, 1447-1450.
- Folinsbee,L.J. (1992) Human health effects of air pollution. *Environ Health Perspect*,



100, 45-56.

- Fraser, D. (1986) Lung cancer risk and diesel exhaust exposure. *Public. Health Rev.*, **14**, 139-171.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 421-426.
- Frei, B., Forte, T.M., Ames, B.N. and Cross, C.E. (1991) Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem. J.*, **277**, 318-329.
- Gallagher, J., George, M., Kohan, M., Thompson, C., Shank, T. and Lewtas, J. (1993) Detection and comparison of DNA adducts after *in vitro* and *in vivo* diesel emission exposures. *Environ. Health Perspect.*, **99**, 225-228.
- Gallagher, J., Heinrich, U. George, M., Hendee, L., Phillips, D.H. and Lewtas, J. (1994) Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis*, **7**, 1291-1299.
- Gao, Y.T., (1986) Smoking and lung cancer in Shanghai. *IARC. Sci. Publ.*, **11**, 121-126.
- Gao, Y.T., Blot, W.J., Ershow, A.G., Hsu, C.W., Levin, L.I. and Fraumeni, Jr., (1987) Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer*, **40**: 604-609.
- Geddie, J.E., Amin, S., Luie, K. and Hecht, S.S. (1987) Formation and tumorigenicity of benzo[b]fluoranthene metabolites in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, **8**, 1579-1584.
- Geneste, O., Camus, A.M., Castegnaro, M., Petruzzelli, S., Macchiarini, P., Angeletti, C.A., Giuntini, C. and Bartsch, H. (1991) Comparison of pulmonary DNA adduct levels, measured by <sup>32</sup>P-postlabeling an aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lung parenchyma of smokers and ex-smokers. *Carcinogenesis*, **12**, 1301-1305.
- Ger, L.P., Hsu, W.L., Chen, K.T. and Chen, C.J. (1993) Risk factors of lung cancer by histological category in Taiwan. *Anticancer Res.*, **13**: 1491-1500.
- Gille, J.J.P., Wientjes, N.M., Lafleur, M.V.M. and Retel, J. (1996) Biological consequences of DNA damage introduced in bacteriophage PM2 DNA by hydrogen peroxide-mediated free radical reactions. *Carcinogenesis*, **17**, 5-11.
- Green, J.P. and Brophy, P. (1982) Carcinoma of the lung in nonsmoking Chinese women. *West J Med.*, **136**: 291-294.
- Grimmer, G. Brune, H. Deutsh-Wenzel, R., Naujack, K.W. Misfeld, J. and Timm, J. (1983a) On the contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons to the carcinogenic impact of automobile exhaust condensate evaluated by local application onto mouse skin. *Cancer Lett.*, **21**.105-113.
- Grimmer, G. Naujack, K.W., Dettbarn, G., Brune, H. Deutsh-Wenzel, R. and Misfeld, J. (1983b) Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons as essential carcinogenic constituents of coal combustion and automobile exhaust using mouse-skin painting as a carcinogen-specific detector. *Toxicol. Environ. Chem.*, **6**, 97-107.
- Grimmer, G. Brune, H., Deutsh-Wenzel, R., Dettbarn, G. and Misfeld, J. (1984) Contribution of polycyclic aromatic hydrocarbone to the carcinogenic impact of gasoline engine exhaust condensate evaluated by implantation into lung of rat. *J. Natl. cancer Intl.*, **72**, 733-735.

- Grimmer, G. Brune, H., Deutsh-Wenzel, R., Dettbarn, G., Jacob, J., Naujack, K.W., Mohr, U. and Ernsh, H. (1987) Contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro-derivatives to the carcinogenic impact of diesel engine exhaust condensate evaluated by implantation into the lungs of rats. *Cancer Lett.*, **37**, 173-180.
- Grinberg-funes, R.A., Singh, V.N., Perera, F.P., Bell, D.A., Young, T.L., Dicky, C., Wang, L.W. and Santella, R.M. (1994) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in smokers and their relationship to micronutrient levels and the glutathione-S-transferase M1 genotype. *Carcinogenesis*, **15**, 2449-2454.
- Grose, K.R., Grant, J.L., Bjeldanes, L.F., Andersen, B.D., Healy, S.K., Lewis, P.R., Felton, J.S. and Hatch, F.T. (1986) Isolation of the carcinogen IQ from fried egg patties. *J. Agric Food Chem.*, **34**, 201-201.
- Guo, N., Conaway, C.C., Hussain, N.S., and Fiala, E.S. (1990) Sex and organ differences in oxidative DNA and RNA damage due to treatment of Sprague-Dawley rats with acetoxime or 2-nitropropane. *Carcinogenesis*, **11**: 1659-1662.
- Gupta, R.C., Reddy, M.V. and Randerath, K. (1982) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092.
- Gupta, R.C. (1985) Enhanced sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.*, **45**, 5656-5662.
- Gupta, R.C. and Earley, K. (1988) <sup>32</sup>P-adduct assay : comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedure. *Carcinogenesis*, **9**, 1687-1693.
- Habs, M., Schmahl, D. and Misfeld, J. (1980) Local carcinogenicity of some environmentally relevant polycyclic aromatic hydrocarbons after lifelong topical applications to mouse skin. *Arch. Geschwulstforsch.*, **50**, 266-274.
- 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.
- Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J.*, **1**, 358-376.
- Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism of action and measurements in mammalian system. *FEBS Lett.*, **281**, 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219**, 1-14.
- Hallstrom, B. and Skjoldebrand, C., (1983) Heat and mass transport in solid foods. *In Development in Food Preservation*, Vol.2, Edited by S. Thorne. PP. 61-94. Applied Science Publishers. Essex.
- Han, X and Liehr, J.G. (1994) DNA single-strand breaks in kidneys of syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis*, **15**: 997-1000.
- Hansson, L-E., Nyren, O., Bergstrom, R., Wolk, A., Baron, J. and Adami, H-O., (1993) Diet and risk of gastric cancer. A population-based case-control study in Sweden. *Int. J. Cancer*, **55**, 181-189.
- Hanrahan, C.F., Bacolod, M.D., Vyas, R.R., Liu, T., Geacintov, N.E., Loechler, E.L. and

- Basu, A.K. (1997). Sequence specific mutagenesis of the major (+)-anti-Benzo[a]-pyrene diol epoxide-DNA adduct at a mutational hot spot in vitro and in *Escherichia coli* cells. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 369-377.
- Hargraves, W.A. and Pariza, M.W. (1984) Mutagens in cooked foods. *J Environ Sci Health, C2* (1): 1-49.
- Harris, C.C. (1993) The p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Science*, **262**, 1980-1981.
- Harris, C.C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res., Suppl.* **51**, 5023s-5044s.
- Harris, C.C. (1989) Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis*, **10**, 1563-1566.
- Hart, B.A., Voss, G.W. and Vacek, P.M. (1993) Methallothionein in human lung carcinoma. *Cancer Lett.*, **75**: 121-128.
- Hazardous Substances Data Bank. (1988) National Library of Medicine. National Toxicology Program, Bethesda, MD. December 5.
- He, Q.C., Lioy, P.J., Wilson, W.E. and Chapman, R.S. (1993) Effects of air pollution on children's pulmonary function in urban and suburban areas of Wuhan, People's Republic of China. *Arch. Environ. Health*, **48**, 382-391.
- Hederson, B.E. and Louie, E. (1978) Discussion of risk factors for nasopharyngeal carcinoma. In: "Nasopharyngeal Carcinoma: Etiology and Control" (G de-The, Y Ito and W Davis, eds), *IARC Scientific Publication No. 20. International Agency for Research on Cancer, Lyon.*
- Higginbotham, S., Rama Krishna, N.V.S., Johansson, S.L., Rogan, E.G. and Cavalieri, E.L. (1993) Tumor-initiating activity and carcinogenicity of dibenzo[a,l]pyrene versus 7, 12-dimethylbenzo[a]anthracene and benzo[a]pyrene at low doses in mouse skin. *Carcinogenesis*, **14**, 875-878.
- Homburger, F. and Boger, E. (1968) The carcinogenicity of essential oils, flavors, and spices. *Cancer Res.*, **28**, 2372-2374.
- Hsu, I., Metcalf, R., Sun, T., Welsh, J. and Harris, C. (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, **350**, 427-428.
- Hughes, N.C. and Phillips, D.H. (1993) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of the covalent binding of benzo[g,h,i]perylene to DNA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*, **14**, 127-133.
- Hughes, N.C., Pfau, W., Hewer, A., Jacob, J., Grimmer, G. and Phillips, D.H. (1993) Covalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbon components of coal tar to DNA in mouse skin. *Carcinogenesis*, **14**, 135-144.
- Hughes, N.C., Pfau, W., Hewer, A., Jacob, J., Grimmer, G., and Phillips, D.H., (1993) Covalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbon components of coal tar to DNA in mouse skin. *Carcinogenesis*, **14**: 135 -144.
- Hurst, J.K. and Barrette, W.C. (1989) Leucocyte oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 271-278.
- IARC (1983) Benzo[b]fluoranthene. In IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 23, Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data. *International Agency for Research on Cancer, Lyon, France*, pp. 147-154.

- Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takenoshita, Y. and Sagai, M. (1997) Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, **18**, 185-192.
- 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.
- IRAC (1989) *IRAC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Vol 46, *Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes*, Lyon, pp. 47-57.
- 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.
- Iwai, K., Udagawa, T., Yamagishi, M. and Yamada, H. (1986) Long-term inhalation studies of diesel exhaust on F344 SPF rats. Incidence of lung cancer and lymphoma. In: Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R.O. and Stober, W., eds, *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust*, Amsterdam, Elsevier, pp. 349-360.
- Izzotti, A., Rossi, G.A., Bagnasco, M. and deFlora, S. (1991) Benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts in alveolar macrophages of smokers. *Carcinogenesis*, **12**, 1281-1285.
- Jagerstard, M., Skog, K., Grivas, S. and Olsson, K. (1991) Formation of heterocyclic amines using model system. *Mutat. Res.*, **210**, 1-8.
- Jagerstard, M., Olsson, K., Grivas, S., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., and Sugimura, T., (1984) Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose. *Mutat. Res.*, **126**, 239-244.
- Janssen, Y.M.W., Horten, B., Borm, P.J.A. and Mossman, B.T. (1993) Cell and tissue responses to oxidative damages. *Lab. Invest.*, **69**, 261-274.
- Jaruga, P., Zastawny, T.H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M., Olinski, R. (1994) Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Letters*, **341**, 59-64.
- Jeffrey, A.M., Jennette, K.W., Blobstein, S.H., Weinstein, I.B., Beland, F.A., Harvey, R.G., Kasai, H., Miura, I. and Nakanishi, K. (1976) Benzo[a]-pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: Structure of a benzo[a]-pyrene-tetrahydro-diol epoxide-guanosine adduct. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5714-5715.
- Jeffrey, A.M., Weinstein, J.B., Gennette, K.W., Grzeskowiak, K., Nakanishi, K., Harvey, R.G., Autrup, H. and Harris, C. (1977) Structures of benzo[a]pyrene-nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature*, **269**, 348-350.
- Kasai, H., Yamaizumi, Z., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T., Spingarn, N.E., Weisburger, J.H. and Nishimura, S. (1980) Potent novel mutagens produced by boiling fish under normal conditions. *Pro. Japan Acad.*, **56(B)**, 278-283.
- Kasai, H. and Nishimura, S. (1991) Formation of 8-hydroxydeoxy-guanosine in DNA by

- oxygen radicals and its biological significance. In Sies, H. (eds) *Oxidative stress, oxidant and antioxidants*, London, Academic Press, Ltd., pp. 99-116.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace Jr. A.J. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71**, 587-597.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Graig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, **51**, 6304-6311.
- Kato, R. (1986) Metabolic activation of mutagenic heterocyclic amines from protein pyrolysates. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 308-347.
- Kato, R. and Yamazoe, Y. (1987) Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates. *Jpn. J. cancer Res.*, **78**, 297-311.
- Kehrer, J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**, 21-48.
- Keiding, L.M., Rindel, A.K. and Kronborg, D. (1995) Respiratory illnesses in children and air pollution in Copenhagen. *Arch. Environ. Health*, **50**, 200-206.
- Kelley, D.J., Mestre, J.R., Subbaramaiah, K., Sacks, P.G., Schantz, S.P., Tanabe, T., Inoue, H., Ramonetti, J.T., and Dannenberg, A.J. (1997) Benzo[a]P up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis*, **18**, 795-799.
- Kikugawa, K., Kato, T. and Hayatsu, H. (1986) The presence of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in smoked dry bonito (katsubushi). *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 99-102.
- Kim, H.S. and Lee, B.M. (1997) Inhibition of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis miller*. *Carcinogenesis*, **18**, 771-776.
- 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.
- Kinouchi, T., Hideshi, T. and Ohnishi, Y., (1986) Detection of 1-nitropyrene in Yakatori (grilled chicken), *Mutat. Res.*, **171**, 105-113.
- Koo, L.C., Ho, J.H. and Lee, N. (1985) An analysis of some risk factors for lung cancer in Hong Kong. *Int. J. Cancer*, **35**, 149-155.
- Koo, L.C., Ho, J.H., (1990) Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int. J. Epidemiol.*, **19**(suppl1): S14-S23.
- Kung, I.T.M., So, K.F. and Lam, T.H. (1984) Lung cancer in Hong Kong Chinese: Mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer*, **50**, 381-388.
- Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- LaVoie, E.J., Braley, J., Rice, J.E. and Rivensen, A. (1987) Tumorigenic activity of nonalternant polynuclear aromatic hydrocarbons in newborn mice. *Cancer Lett.*, **34**, 15-20.
- LaVoie, E.J., Amin, S., Hecht, S.S., Furuya, K. and Hoffmann, D. (1982) Tumour initiating activity of dihydrodiols of benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene and benzo[k]fluoranthene. *Carcinogenesis*, **3**, 49-52.



- Law,H and Day,N.E. (1976) Incidence rates of specific histological types of lung cancer in Singapore Chinese dialect group and their aetiological significance. *Int J Cancer*, **17**: 304-309.
- Layton,D.W., Bogen,K.T., Knize,M.G., Hatch,F.T., John,V.M. and Felton,J.S. (1995) Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis*, **16**:39-52.
- Lee,H., Perng,L.Y., Shiow,S.J. and Lin,J.Y. (1986) Mutagenicity of airborne particles in Taichung area. *J Chin Oncol Soc*, **2**, 17-23.
- Lee,H., Yur,J.H., Shiow,S.J. and Lin,J.Y. (1988) The mutagenic activity of smog airborne particles collected from combustion products. *J Chin Oncol Soc*, **4**, 1-8.
- Lee,H. and Tsai,S.J. (1991a) Effect of emodin on cooked-food mutagen activation. *Food Chem.Toxicol.*, **29**, 765-770.
- Lee,H., Law,S.M. and Lin,S.T. (1991b) The effect of extration solvent on the mutagenicity of airborne particles. *Toxcol. Lett.*, **58**, 59-67.
- Lee,H. and Chan,S.C. (1992) Comparative antimutagenicity of quinizarin and chlorophyllin against environmental mutagens in Ames *Salmonella* system. *J. Chinese Oncol. Soc.*, **8**, 1-9.
- Lee,H., Lin,M.Y. and Lin,S.T. (1994 a) Characterization of the mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline prepared from a 2-methyl-pyridine / creatinine / acetylformaldehyde model system. *Mutagenesis*, **9**, 157-162.
- Lee,H., Lin,T.L., Shieh,R.L. and Bian,S.S. (1994b) Mutagenicity of airborne particulates from combustion of electric cables in a waste metal retrieval area. *Mutat. Res.*, **324**, 77-84.
- Lee,H., Wang,H.W., Su,H.Y. and Hao,N.J. (1994 c) The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline. *Mutagenesis*, **9**, 101-106.
- Lee,H., Su,S.Y., Liu,K.S. and Chou,M.C. (1994d) 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. (1994e) Bacterial mutagenicity, metabolism, and DNA adduct formation by binary mixtures of benzo[a]pyrene and 1-nitropyrene. *Environ. and Mol. Mutagen.* **24**, 229-234.
- Lee,H., Lin,M.Y., and Lin,ST. (1994f) Formation of identification of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in boiled pork juice., *Mutat Res.*, **308**, 77-88.
- Lee,H., Wang,L. and Shih,J.F. (1995) Mutagenicity of particulates from the laboratory combustin of plastics. *Mutat. Res.*, **346**, 135-144.
- Lee,H. and Shih,M.K. (1995) Mutation spectrum of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-quinoline in the HPRT locus of CHO-K1 cells. *Mol. Carcinogenesis*, **13**:122-127.
- Lee,H., Lin,S.T. and Cherng,S.H. (1996) Modulatory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of 1-nitropyrene: a structure-activity relationship study. *Mutation Res.*, **367**, 177-185.
- Lee,S.J., Friedman,S.L., whalen,R. and Boyer,T.D. (1994) Cellular sources of glutathione S-transferase P in primary cultured rat hepatocytes: Localization by in situ hybridization. *Biochem. J.*, **299**, 79-83.

- Lepage, G., Munoz, G., Champagne, J. and Roy, C. (1991) Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **197**, 277-283.
- Lewtas, J. and Nishioka, M.G. (1990) Nitroarene : their detection, mutagenicity 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.
- Lewtas, J., Mumford, J., Everson, R., Hulka, B., Wilcosky, T., Kozumbo, W., Thompson, C., George, M., Dobias, L., Sram, R., Li, X. and Gallagher, J. (1993) Comparison of DNA adducts from complex mixture exposures in various human tissues and experimental systems. *Environ. Health Perspect.*, **99**, 89-97.
- Li, A.P. and Royer, R.E. (1982) Diesel-exhaust-particulate enhancement of chemical-induced mutagenesis in cultured Chinese hamster ovary cells: possible interaction of diesel exhaust with environmental carcinogens. *Mutat. Res.* **103**, 349-355.
- Li, E.E., Heflich, R.H., Bucci, T.J., Manjanatha, M.G., Blaydes, B.S. and Delclos, K.B. (1994) Relationships of DNA adduct formation, K-ras activating mutations and tumorigenic activities of 6-nitro-chrysene and its metabolites in the lungs of CD-1 mice. *Carcinogenesis*, **15**, 1377-1385.
- Li, S.G., Pan, D.H. and Wang, G.X. (1994) analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch. Environ. Health*, **49**, 119-122.
- Li, Y. and T.M.A. (1994) Reactive Oxygen-dependent DNA Damage Resulting from the Oxidation of Phenolic compounds by a Copper-Redox Cycle Mechanism. *Cancer Research*, **54**, 1895s-1898s.
- Lilienblum, W., Bock-Hennig, B.S., and Bock, K.W. (1985) Protection against toxic redox cycles between benzo[a]pyrene-3,6-quinone and its quinol by 3-methylcholanthrene-inducible formation of the quinol mono- and diglucuronide. *Mol. Pharma.*, **27**: 451-458.
- Lioy, P.L., Waldman, J.M., Greenberg, A., Harkov, R. and Pietarinen, C. (1988) The total human environmental exposure study (THEES) to benzo[a]pyrene: comparison of the inhalation and food pathways. *Arch. Environ. Health*, **43**, 304.
- Lioy, P.L. and Greenberg, G. (1990) Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Ind. Health*, **6**, 209-215.
- Liu, Q., Sasco, A.J., Riboli, E., Hu, M.X., (1993) Indoor air pollution and lung cancer in Guangzhou, People's Republic of China. *Am. J. Epidemiol.*, **137**: 145-154.
- Liu, Z., Xingzhou, H.E. and Chapman, R.S. (1991) Smoking and other risk factors for lung cancer in Xuanwei, China. *Int. J. Epidemiology*, **20**, 26-31.
- Lofroth, G., Stensman, C. and Brandhorst-Satzkorn, M. (1991) Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning. *Mutat. Res.*, **261**, 21-28.
- Lofroth, G., Hefner, E., Alfheim, I., and Moller, M. (1980) Mutagenic activity in photocopies. *Science*, **209**, 1037.
- MacLennan, R., da Costa, J., Day, N.E., Law, C.H., Ng, Y.K. and Shanmugaratnam, K. (1997) Risk factors for lung cancer in Singapore Chinese, a population with high female incidence rates. *Int. J. Cancer.*, **20**, 854-850.
- MacLeod, M.C., Powell, K.L. and Tran, N. (1995) Binding of the transcription factor, Sp1, to non-target sites in DNA modified by benzo[a]pyrene diol epoxide. *Carcinogenesis*.

16. 975-983.

- 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.
- Manchester, D.K., Weston, A., Choi, J.S., Trivers, G.E., Fennessy, P.V., Quintana, E., Farmer, P.B., Mann, D.L. and Harris, C.C. (1988) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9243.
- Marnett, L.J. and Burcham, P.C. (1993) Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**: 771-785.
- Marnett, L.J., Basu, A.K., O'Hara, S.M., Weller, P.E., Rahman, A.F.M.M. and Oliver, J.P. (1986). Reaction of malondialdehyde with guanine nucleosides: formation of adducts containing Oxadiazabicyclononene residues in the base-pairing region. *J. Am. Chem. Soc.* **108**. 1348-1350.
- Maron, D.M., and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**: 173-215.
- Martins, E.A.L., Chubatsu, L.S. and Meneghini, R. (1991) Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. *Mutation Res.*, **250**: 95-101.
- Masclat, P., Mouvie, R.G. and Nikolaou, K. (1986) Relative decay index and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmos Environ*, **20**, 439-445.
- Mass, M.J., Jeffers, A.J., Ross, J.A., Nelson, G., Galati, A.J., Stoner, G.D., and Nesnow, S. (1993) Ki-ras oncogene mutations in tumors and DNA adducts formed by benzo[a]pyrene in the lungs of strain A/J mice. *Mol. Carcinogen.* **8**, 186-192.
- Mass, M.J., Abu-Shakra, A., Roop, B.C., Nelson, G., Galati, A.J., Stoner, G.D. Nesnow, S. and Ross, J.A. (1996) Benzo[b]fluoranthene: tumorigenicity in strain A/J mouse lungs, DNA adducts and mutations in the Ki-ras oncogene. *Carcinogenesis*, **17**, 1701-1704.
- 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.
- Mauthe, R.J., Cook, V.M., Coffing, S.L., and Baird, W.M. (1995). Exposure of mammalian cell cultures to benzo[a]pyrene and light results in oxidative DNA damage as measured by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Carcinogenesis*, **16**, 133-137.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, and Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139.
- McLemore, T.L., Adelberg, S., Czerwinski, M., Hubbard, W.C., Yu, S.J., Storeng, R., Wood, T.G., Hines, R.N. and Boyd, M.R. (1989) Altered regulation of the cytochrome P4501A1 gene: novel inducer-independent gene expression in pulmonary carcinoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1787-94.
- McManus, M.E., Felton, J.S., Knize, M.G., Burgess, W.M., Pond, S.M., Thomson, S.R., Stupans, I. and Veronese, M.E. (1989) Activation of the food-derived mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by the rabbit and human liver microsomes and purified forms of cytochrome P450. *Carcinogenesis*, **10**, 357-363.
- Menck, H.R., Casagrande, J.T. and Henderson, B.E. (1974) Industrial air pollution:



- possible effect on lung cancer. *Science*, **183**, 210-212.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayed, S. and Kevekordes, S. (1992) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutat. Res.*, **278**, 1-9.
- Miguel, A.G., Daisey, J.M. and Sousa, T.A. (1990) Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ. Mol. Mutagen.*, **15**, 36-43.
- Moscow, J.A., Fairchild, C.R., Madden, M.J., Ransom, D.T., Wieand, H.S., O'Brien, E.E., Poplack, D.G., Cossman, J., Myers, C.E. and Cowan, K.H. (1989) Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res.*, **49**, 1422-1428.
- Mumford, J.L., He, X.Z., Chapman, R.S., Cao, S.R., Harris, D.B., Li, X.M., Xian, Y.L., Jiang, W.Z., Xu, C.W., Chuang, J.C., Wilson, W.E. and Cooke, M. (1987) Lung cancer and indoor air pollution in Xuan Wei, China. *Science*, **235**, 217-220.
- Mumford, J.L., Williams, R.W., Walsh, D.B., Burton, R.M., Svendsgaard, D.J., Chuang, J.C., Houk, V.S. and Lewtas, J. (1991) Indoor air pollutants from unvented kerosene heater emissions in mobile homes studies on particles, semivolatile organics, carbon monoxide, and mutagenicity. *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 1732-1736.
- Mumford, J.L., Li, X., Hu, F., Lu, X.B. and Chuang, J.C. (1995) Human exposure and dosimetry of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine Xuan Wei, China with high lung cancer mortality associated with exposure to unvented coal smoke. *Carcinogenesis*, **16**, 3031-3036.
- Nagao, M., Sato, S. and Sugimura, T. (1983) Mutagens produced by heating foods. In: Waller, G.R. and Feather, M.S. (Eds) "The Maillard Reaction in Food and Nutrition." *Am. Chem. Soc.*, Wash. D. C., **215**, 512-536.
- Nagashima, M., Kasai, H., Yokota, J., Nagamachi, Y., Ichinose, T. and Sagai, M. (1995) Formation of an oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy-guanosine, in mouse lung DNA after intratracheal instillation of diesel exhaust particles and effects of high dietary and beta-carotene on the process. *Carcinogenesis*, **16**, 1441-1445.
- Nakayama, T., Kodama, M., and Nagata, C., (1984) Generation hydrogen peroxide and superoxide anion radical from cigarette smoke. *Gann.*, **75**: 95-98.
- 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**, 221-217.
- Nemoto, N. and Takayama, S. (1984) Activation of 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-a : 3', 2'-d]imidazole, a mutagenic pyrolysis product of glutamic acid, to bind to microsomal protein by NADPH-dependent and -independent enzyme systems. *Carcinogenesis*, **5**, 653-656.
- Nesnow, S., Ross, J.A., Stoner, G.D. and Mass, M.J. (1995) Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice. *Toxicology*, **105**, 403-413.
- Ni, Y.C., Kadlubar, F.F. and Fu, P.P. (1995) Formation of malondialdehyde-modified 2-deoxyguanosinyl adduct from metabolism of chloral hydrate by mouse liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 1110-1117.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. and Fukushima, S. (1983) Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**,

3984-3987.

- Nukaya,H., Koyota,S., Jinno,F., Ishida,H., Wakabayashi,K., Kurosaka,R., Kilm,I.S., Yamaizumi,Z., Ushiyama,H., Sugimura,T., Nagao,M. and Tsuji,K. (1994) Structural dehyermination of a new mutagenic heterocyclic amine, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline (7,9-DiMeIgQx) present in beef extract. *Carcinogenesis*, **15**(6), 1151-1154.
- 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.
- Pahlman,R. and Pelkonen,O. (1987) Mutagenicity studies of different polycyclicaromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogenesis*, **8**, 773-778.
- Park,J.Y., Cundy,K.C. and Ames,B.N. (1981). Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis*, **10**, 827-832.
- Park,J.Y., Shigenaga,M.K., Ames,B.N.(1996) Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)-carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **6**, 2322-2327.
- Phillips,D.H., Hewer,A., Martin,C.N., Garner,R.C. and King,M.M. (1988). Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature (Lond)*, **336** : 790-792.
- Phillips,D.H., schoket,B., Hewer,A., Bailey,E., Kostic,S. and Vincze,I. (1990a) Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer*, **46**, 569.
- Phillips,H.D., Hewer,A., Malcolm,A.D.B., Ward,P. and Coleman,D.V.(1990b)Smoking and DNA damage in cervical cells. *Lancet*, **335**, 417-421.
- Plakunov,I., Smolarek,T.A., Fischer,D.L., Wiley,J.C.J. and Baird,W.M (1987) Separation ion-pair high-performance liquid chromatography of the glucuronide, sulfate and glutathione conjugates formed from benzo[a]pyrene in cell cultures from rodents, fish and humans. *Carcinogenesis*, **8**, 59-66.
- Qu,Y.H., Xu,G.X., Zhou,J.Z., Chen,T.D., Zhu,L.F., PG Shields,P.G., Wang,H.W. and Gao,Y.T. (1992) Genotoxicity of heated cooked oil vapors. *Mutation Res.*, **298**: 105-111.
- Quan,T., Reiners,J.J., Bell,A.O., Hong,N. and States,J.C. (1994) Cytotoxicity and genotoxicity of (±)-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol in CYP IA1-expressing human fibroblasts quantitatively correlate with CYP IA1 expression level. *Carcinogenesis*, **15**, 1827-1832.
- Raachou-nielsen,O., Nielsen,M.L. and Gehl,J. (1995) Traffic-related air pollution: Exposure and health effects in copehagen streetcleaners and cemetery workers. *Arch. Environ. Health*, **50**, 207-213.
- Ragnotti,G.,M. Presta,J.A., Maier,M. Rusnati,M., Mazzoleni,G.,Legati,F., Chiesa,R., Braga,M. and Calovini,D. (1987) Critical role of gonadal hormaones on the genotoxic activity of the hepatocarcinogen DL-ZAMI 1305. *Cancer Lett.*, **36**: 253-261.
- Ramet,M., Castren,K., Jarvinen,K., Pekkala,K., Turpeenniemi-Hujanen,T., Soini,Y.,

- Pakko,P. and Vahakangas,K. (1995) p53 protein expression is correlation with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, **16**, 2117-2124.
- Ramdahl,T. (1986) Characterization of polar compounds such as polycyclic aromatic ketones in air pollution including wood smoke. *Environ. Inter.*, **11**, 197-203.
- Ramdahl,T., Zielinska,B., Arey,J., Atkinson,R., Winer,A.M. and Pitts,Jr. J. N. (1986) Ubiquitous occurrence of 2-nitrofluoranthene and 2-nitropyrene in air. *Nature (Lodon)*, **321**, 425-427.
- Randerath,E., Avitts,T.A., Reddy,M.V., Miller,R.H., Everson,R.B. and Randerath,K. (1986) Comparative <sup>32</sup>P-analysis of cigarette smoke induced DNA damage in human tissues and mouse skin. *Cancer Res.*, **46**, 5869-5877.
- Randerath,E., Danna,T.F., and Randerath,K. (1992) DNA damage induced by cigarette smoke condensate in vitro as assayed by <sup>32</sup>P-postlabeling. Comparison with cigarette smoke-associated DNA adduct profiles in vivo. *Mutation Research*, **268**, 139-153.
- Randerath,E., Mittal,D. and Randerath,K. (1988) Tissue distribution of covalent DNA damage in mice treated dermally with cigarette tar preference for lung and heart DNA. *Carcinogenesis*, **9**, 75-80.
- Randerath,E., Miller,R.H., Mittal,D., Avitts,T.A., Dunsford,H.A. and Randerath,K. (1989) Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 341-347.
- Randerath,K., Liehr,J.G., Gladek,A., and Randerath,E., (1989) Age-dependent covalent DNA alterations (I-compounds) in rodent tissues : species, tissue and sex specificities. *Mutation Res.*, **219**, 121-133.
- Rannug,U. and Sundvall,A. (1985) Mutagenic properties of gasoline exhausts. *Environ. Int.*, **11**, 303-309.
- Reali,D., Schlitt,H., Lohse,C., Barale,R. and Loprieno,N. (1984) Mutagenicity and chemical analysis of airborne particulates from a rural area in Italy. *Environ. Mutagen.*, **6**, 813-823.
- Reddy,M.V., Bleicher,W.T., Blackburn,G.R., and Mackerer,C.R., (1990) DNA adduction by phenol, hydroquinone, or benzoquinone *in vitro* but not *in vivo*: nuclease P1-enhanced <sup>32</sup>P-postlabeling of adducts as labeled nucleoside bisphosphates, dinucleotides and nucleoside monophosphates. *Carcinogenesis*, **11**: 1349-1357.
- Reddy,M.V. and Randerath,K. (1990) A comparison of DNA adduct formation in white blood cell and internal organs of mice exposed to benzo[a]pyrene, dibenzo[c,g]-carbazole, safrole and cigarette smoke condensate. *Mutat. Res.*, **241**, 37-48.
- Richard,A.M. and Woo,Y.T. (1990) A Case-SAR analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenicity. *Mutat. Res.*, **242**, 285-303.
- Richter,C., Park,J.W. Ames,B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Soc. Acad. Sci. USA*, **85**: 6465-6467.
- 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.

- Robertson, I.G.C., Jansson, H., Mannervik, B. and Jenstrom, B. (1986) Glutathione transferase in rat lung: the presence of transferase 7-7, highly efficient in the conjugation of glutathione with the carcinogenic (-)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\beta$ ,10 $\alpha$ -oxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **7**, 295-299.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A.P.M., Rutten, A.A.J.J.L. and Baan, R.A. (1993) Comparative <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes. *Carcinogenesis*, **14**, 1945-1950.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A.P.M., Melis, O.W.M., Wittekoek, M.E., Rutten, A.A. J.J.L., Feron, V.J. and Baan, R.A. (1994) DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogenesis*, **15**, 661-665.
- Rojas, M. and Alexandrov, K. (1986) In vivo formation and persistence of DNA and protein adducts in mouse and rat skin exposed to ( $\pm$ )benzo-[a]pyrene-4,5-oxide. *Carcinogenesis*, **7**, 235-240.
- Romert, L., Dock, J., Jansen, D. and Jenstrom, B. (1989) Effects of glutathione transferase activity on benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol metabolism and mutagenesis studied in a mammalian cell co-cultivation assay. *Carcinogenesis*, **10**, 1701-1707.
- Roscher, E., and Wiebel, F.J. (1992) Genotoxicity of 1,3- and 1,6-dinitro-pyrene: 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, R.O. and Stober, W. (eds) "*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhausts.*": Amsterdam. 141-148.
- Ross, J.A., Nelson, G., Holden, K.L. et al. (1992) DN adducts and induction of sister chromatid exchanges in the rat following benzo[b]-fluoranthene administration. *Carcinogenesis*, **13**, 1731-1734.
- Rothman, N., Oirier, M.C., Baser, M.E., Hansen, J.A., Gentile, C., Bowman, E.D. and Strickland, P.T. (1990) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells during consumption of charcoal-broiled beef. *Carcinogenesis*, **11**, 1241-1246.
- Rowlands, J.C. and Gustafsson, J. (1997) Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Critical Reviews in Toxicology*. **27**. 109-134.
- Roy, A.K., El-Bayoumy, K. and Hecht, S.S. (1989) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of 1-nitropyrene-DNA adducts in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **10**, 195-198.
- Roy, D., Floyd, R.A. and Liehr, J.G. (1991) Elevated 8-hydroxydeoxy-guanosine levels in DNA of diethylstilbestrol-treated Syrian hamsters: Covalent DNA damage by free radicals generated by redox cycling of diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, **51**: 3882-3885.
- Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D.H. and Haugen, A. (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.*, **54**, 5801-5803.
- Rylander, R. (1990) Environmental exposures with decreased risks for lung cancer ? *Int J*

*Epidemiol*, **19**, S67-S72.

- Sakai, M., Yoshida, D. and Mizusaki, S. (1985) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat. Res.*, **156**, 61-67.
- Savelle, K., King, L., Gallagher, J. and Lewtas, J. (1995) <sup>32</sup>P-Postlabeling and HPLC separation of DNA adducts formed by diesel exhaust extracts *in vitro* and in mouse skin and lung after topical treatment. *Carcinogenesis*, **16**, 2083-2089.
- Schoenberg, J.B., Klotz, J.B., Wilcox, H.B., (1990) Case-control study of residential radon and lung cancer among New Jersey women. *Cancer Res.* **50**: 6520-6524.
- Schoket, B., Horkay, I., Kosa, A., Paldeak, L., Hewer, A., Grover, P.L. and Phillips, D. H. (1990) Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients, in human skin in organ culture, and in mouse skin and lung following topical application of coal-tar and juniper tar. *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 241-246.
- Schooten, F.J. van Hillebrand, M.J.X., van Leeuwen, F.E., Lutgerink, J.T., van Zandwijk, N., Jansen, H.M. and Kriek, E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients, *Carcinogenesis*, **11**, 1677-1681.
- Schut, H.A.J. (1993) Effect of dietary menhaden oil on DNA adduct of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the Fischer 344 rat. *Anticancer Res.*, **13**, 1517-1524.
- Schut, H.A.J. (1994) Dietary modulation of DNA adduct of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the male Fischer 344 rat. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 57-60.
- Seidman, L.A., Moore, C.J. and Gould, M.N. (1988) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts in human and rat mammary epithelial cells *Carcinogenesis*, **9**, 1071-1076.
- Seto, H., Ohkubo, T., Koike, H., Saito, M. and Sasano, H. (1994) Significant formation of 8-hydroxydeoxyguanosine through interaction of diesel particulate matter with deoxyguanosine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 789-795.
- Sflomos, C., Rapadopoulou, R. and Athanasiou, K. (1989) Temperature and time effects on mutagen production in cooked lamb meat. *Mutagenesis*, **4**, 228-229.
- Shen, H.M., Ong, C.N., Lee, B.L. and Shi, C.Y. (1995) Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis*, **16**, 419-422.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Lee, H.P. and Ong, C.N. (1994) Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**, 145-150.
- Shibamoto, T. (1989). Genotoxicity testing of Maillard reaction products. In: *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition.*, Alan R. (eds), Liss Inc. PP. 359-376.
- Shields, P.G., Bowman, E.D., Harrington, A.M., Doan, V.T. and Weston, A. (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res.*, **53**, 3486-3492.
- Shigenaga, M.K., Park, J.W., Cundy, K.C., Gimeno, C.J. and Ames, B.N. (1990) In vivo oxidative DNA damage: Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Meth. Enzymol.*, **186**, 521-530.
- 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.

- Shimada, T., Martin, M. V., Pruess-Schwartz, D., Marnett, L. J. and Guengerich, F. P. (1989) Roles of individual human cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of benzo[a]pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, **49**, 6304-6312.
- Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K. I., Wakabayashi, K., Surgimura, T. and Ito, N., (1997) The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) Derived from cooked foods. *Cancer Res.*, **57**: 195-198.
- 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.
- 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.
- Snyderwine, E. G., Wirth, P. J., Roller, P. P., Adamson, R. H., Sato, S. and Thorgeirsson, S. S. (1988) Mutagenicity and in vivo covalent DNA binding of 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis*, **9**, 411-418.
- Stadtman, E. R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science*, **257**, 1220-1222.
- Strandell, M., Zakrisson, S., Alsberg, T., Westerholm, R., Winqvist, L. and Rannug, U. (1994) Chemical analysis and biological testing of a polar fraction of ambient air, diesel engine, and gasoline engine particulate extracts. *Environ. Health Perspect*. **102**, 85-92.
- Sugimura, T. (1982) Mutagens, carcinogens and tumor promoters in our daily food. *Cancer*, **49**, 1970-1984.
- Sugimura, T., Sato, S. and Wakabayashi, K. (1988) Mutagens/carcinogens in pyrolysates of amino acid and proteins and in cooked foods: Heterocyclic aromatic amines. In: Woo, Y. T., Lai, D. Y., Arcos, J. C. and Argue, M. F. (eds) *Chemical induction of cancer, structural Bases and biological Mechanisms*. Academic Press, New York, pp. 681-710.
- Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1990) Mutagens and carcinogens in food. In: Pariza, M. W., Aescabacher, H. U., Felton, J. S. and Sato, S. (Eds) *"Mutagens and carcinogens in the diet."* Wiley-Liss, Inc., New York, 1-18.
- Sullivan, P. D. (1985) Free radicals of benzo[a]pyrene and derivatives. *Environ. Health Perspect.*, **64**: 283-295.
- Suzuki, J., Watanabe, T., and Suzuki, S., (1988a) Formation of mutagens by photochemical reaction of 2-naphthol in aqueous nitrite solution. *Chem. Pharm. Bull.*, **36(6)**: 2204-2211.
- Suzuki, J., Watanabe, T., Sato, K., and Suzuki, S., (1988b) Roles of Oxygen in photochemical reaction of naphthols in aqueous nitrite solution and mutagen formation. *Chem. Pharm. Bull.*, **36(11)**: 4567-4575.
- Swedmark, S., Romert, L., Morgenstern, R. and Jenssen, D. (1992) Studies on glutathione transferases belonging to class pi in cell lines with different capabilities

- for conjugating (+)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -oxy-7,8,9,10-tetra-hydrobenzo[a]-pyrene. *Carcinogenesis*, **13**, 1719-1723.
- Tachino, N., Hayashi, R., Liew, C., Bailey, G. and Dashwood, R. (1995) Evidence for ras gene mutation in 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline-induced colonic aberrant crypts in the rat. *Mol. Carcinog.* **12**(4), 187-192.
- Takahashi, T., Gazdar, A.F. and Chiba, I. (1989) p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, **246**, 491-494.
- Takagi, Y., Koo, L.C., Osada, H., Ueda, R., Kyaw, K., Ma, C.C., Suyama, M., Saji, S., Takahashi, T., Tominaga, S. and Takahashi, T. (1995) Distinct mutational spectrum of the p53 gene in lung cancers from Chinese women in Hong Kong. *Cancer Res.*, **55**, 5354-5357.
- Takamura, T., Chiba, T. and Tejima, S. (1981) Identification of a reactive metabolite of the mutagen, 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]-quinoline. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 590-593.
- Makino, H., Ishizaka, Y., Tsujimoto, A., Nakamura, T., Onda, M., Sugimura, T. and Nagao, M. (1992) Rat p53 gene mutation in primary Zymbal gland tumors induced by 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 4850-4854.
- Takahashi, T., Gazdar, A.F. and Chiba, I. (1989) p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, **246**, 491-494.
- 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.
- Tanaka, T., Barnes, W.S., Williams, G.M. and Weisburger, J.H. (1985) Multipotential carcinogenicity of the fried food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline in rat. *Grann.*, **76**, 570-576.
- Tappel, A.L. (1973) Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, **32**, 1870-1874.
- Teschke, K., Hertzman, C.V., Netten, E., Lee, B., Morrison, A., Cornista, G., Lau and A Hundal (1989) Potential exposure of cooks to airborne mutagens and carcinogens. *Environ Res.*, **50**: 296-308.
- Tokiwa, H. and Ohnishi, Y. (1986) Mutagenicity and carcinogenicity on nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-70.
- 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.
- Toyokuni, Shinya. and Sagripanti, J.L. (1996) Association between 8-hydroxy-2-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**, 859-864.
- Treiber, D.K., Zhai, X., Jantzen, H.M. and Essigmann, J.M. (1994) Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for ribosomal transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5672-5676.
- Tsuda, M., Negishi, M.C., Makino, R., Sato, S., Yamaizumi, Z., Hirayama, T. and Sugimura, T. (1985) Use of nitrite and hypochlorite treatments in determination of the contributions of IQ type and non-IQ type heterocyclic amines to the

- mutagenicities in crude pyrolyzed materials. *Mutat. Res.*, **147**, 335-341.
- Tuchsen,F. and Nordholm,L., (1986) Respiratory cancer in Danish baker; 10 year cohort study,*Br.J.Ind.Med.*, **43**,516-521.
- Turk,P.W., Laayoun,A., Smith,S.S. and Weitzman,S.A. (1995) DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine(8-hydroxyguanosine affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis*, **16**, 1253-1255.
- Tsuda,M., Negishi,M.C., Makino,R., Sato,S., Yamaizumi,Z., Hirayama,T. and Sugimura,T. (1985) Use of nitrite and hypochloride treatments in determination of the contributions of IQ type and non-IQ type heterocyclic amines to the mutagenicities in crude pyrolyzed materials. *Mutation Res.*, **147**, 335-341.
- Vaca,C.E., Wilhelm,J. and Harms,M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res.*, **195**, 137-149.
- Vaca,C.E., Fang,J.L., Mutanen,M. and Valsta,L. (1995) <sup>32</sup>p-postlabelling determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans : total white blood cells and breast tissue. *Carcinogenesis*.**16**. 1847-1851.
- Vaca,G.E., Vodicka,P. and Hemminki,K. (1992) Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by <sup>32</sup>P-postlabelling. *Carcinogenesis*, **13**: 593-599.
- van Leeuwin,F.E., Lutgerink,J.T., van Zandwijk,N., Jansen,H.M. and Kriek,E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis*, **11**, 1677-1681.
- van Schooten,F.J., Hillebrand,M.J., van Leeuwin,F.E., van Zandwijk,N., Jansen,H.M., den Engelse,L. and Kriek,E. (1992) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells from lung cancer patients : no correlation with adduct levels in lung.*Carcinogenesis*, **13**, 987-993.
- van Schooten,F.J., Hillebrand,M.J.X., van Leewen,F.E., Lutgerink,J.T.,van Zandwijk, N., Jansen,H.M. and Kriek,E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis*, **11**, 1677-1681.
- Venier,P., Clonfero,E., Cottica,D., Gava,C., Zordan,M., Pozzoli,L. and Levis,A.G. (1985) Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis*, **6**, 749-752.
- Verhagen,H., Poulsen,H.E., Loft,S., van Poppel,G., Willems,M.I., and van Bladeren,P. J. (1995) Reduction of oxidative DNA-damage in humans by brussels sprouts. *Carcinogenesis*, **16**: 969-970.
- Verschueren,K., *Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals*. Van Nostrand Reinhold, New York. (1983) 1310-1314.
- Wakabayashi,K., Nagao,M., Esumi,H. and Sugimura,T. (1992) Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.*, (Suppl.) **52**, 2092-2098.
- Wang,M.Y. and Liehr,J.G. (1995a) Lipid hydroperoxide- induced endogenous DNA adducts in hamsters: Possible mechanism of lipid hydroperoxide-mediated carcinogenesis. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **316**, 38-46.
- Wang,M.Y. and Liehr,J.G. (1995b) Induction by estrogens of lipid peroxidation and lipped peroxide-derived malonaldehyde-DNA adducts in male Syrian hamsters: Role of lipid peroxidation in estrogen-induced kidney carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **16**,



1941-1945.

- Wang, P., Yen, V.O. and Tsai, H.T. (1988) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate by high performance liquid chromatography. *J. Chin. Chem. Soc.*, **35**, 13-21.
- Wang, Y.C., Chen, C.Y., Chen, S.K., Cherng, S.H., Ho, W.L., and Lee, H. (1997) High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous-cell lung cancer patients in Taiwan. (submitted).
- Wang, Y.J., Ho, Y.S., Lo, M.J., Lin, J.k. (1995) Oxidative modification of DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. *Chemico-Biological Interactions* **94**, 135-145.
- Watanabe, K. and Ohta, T. (1993) Analysis of mutational specificity induced by heterocyclic amines in the *lac Z* gene of *Escherichia coli*. *Carcinogenesis*, **14**, 1149-1153.
- Weitzman, S.A., Weitberg, A.B. and Stossel, T.P. (1985) Phagocytes as carcinogens: Malignant transformation produced by human neutrophils. *Science*, **227**, 1231-1233.
- Weton, A. and Bowman, E.D. (1991) Fluorescence detection benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung. *Carcinogenesis*, **12**: 1445-1449.
- Weyand, W.H., Patel, S., LaVoie, E.J., Cho, B. and Harvey, R.G. (1990) Relative tumor initiating activity of benzo[b]fluoranthene, benzo[b]-fluoranthene, naphthol[1,2-*b*]-fluoranthene and naphthol[2,1-*a*]fluoranthene on mouse skin. *Cancer Lett.*, **52**, 229-233.
- Weyand, E.H., Cai, Z.W., Wu, Y., Rice, J.E., He, Z.M. and LaVoie, E.J. (1993) Detection of the major DNA adducts of benzo[b]fluoranthene in mouse skin: role of phenolic dihydrodiols. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 568-577.
- 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.
- Wild, D. and Degen, G.H. (1987) Prostaglandin H synthase dependent mutagenic activation of heterocyclic aromatic amines of the IQ-type. *Carcinogenesis*, **8**, 541-545.
- Wills, E.D. (1987) Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: *Biochemical toxicology, a practical approach*. Snell, K., Mullock, B., editors. Oxford: IRL Press, pp.127-152.
- Winn, L.M., and Wells, P.G. (1997) Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo[a]pyrene teratogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**, 607-621.
- Wolterbeek, A.P.M., Roggeband, R., Steenwinkel, M.J.S.T., Bann, R.A. and Rutten, A.A.J.J.L. (1993) Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by <sup>32</sup>P-postlabeling analysis and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis*, **14**, 463-467.
- Wolterbeek, A.P.M., Roggeband, R., Bann, R.A., Feron, V.J. and Rutten, A.A.J.J.L. (1995) Relation between benzo[a]pyrene-DNA adducts, cell proliferation and p53 expression in tracheal epithelium of hamsters fed a high  $\beta$ -carotene diet. *Carcinogenesis*, **16**, 1617-1622.
- Wong, S.H.Y., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N. and Sunderman, F.W. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation

- of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.*, **33**, 214-220.
- Wu-William, A.H., Dai, X.D., Blot, W., Xu, Z., Sun, X.W., Xiao, H.P., Stone, B.J., Yu, S.F., and Feng, Y.P. (1990) Lung cancer among women in north-east China. *Brit J Cancer*, **62**: 982-987.
- Wu, X., and Levine, A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 3602-3606.
- Yang, S.P., Luh, K.T., Kuo, S.H. and Lin, C.C. (1984) Chronological observation of epidemiologic characteristics in Taiwan with etiological consideration : a 30-years consecutive study. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **14**, 7-19.
- Yamazoe, Y., Shimada, M., Kamataki, T. and Kato, R. (1983) Microsomal activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a pyrolysate of sardine and beef extracts, to a mutagenic intermediate. *Cancer Res.*, **43**, 5768-5774.
- Yamazoe, Y., Abu-Zeid, M., Gong, D., Staiano, N. and Kato, R. (1989) Enzymatic acetylation and sulfation of N-hydroxyl-amines in bacteria and rat livers. *Carcinogenesis*, **10**, 1675-1679.
- Yang, C.C., Jenq, S.N. and Lee, H. (1997) Characterization of the carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in cooking aerosol under domestic condition. (submitted).
- Yang, J.L., Maher, V.M. and McCormick, J.J. (1987) Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of ( $\pm$ )-7 $\beta$ -8 $\alpha$ -dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene replicates in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 3787-3791.
- Yarborough, A., Zhang, Y. J., Hsu, T. M. and Santella, R.M. (1996) Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B<sub>1</sub>-treated rat liver and human oral mucosal cells. *Cancer Res.*, **56**, 683-688.
- Yu, M.C., Mo, C.C., Chong, W.X., Yeh, F.S. and Henderson, B.E. (1988) Preserved foods and nasopharyngeal carcinoma: case-control study in Guangxi, China. *Cancer Res.*, **48**, 1954-1959.
- Zu, H.X. and Schut, H.A.J. (1991) Formation and persistence of DNA adduct of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in male Fischer-344 rats. *Cancer Res.*, **51**, 5636-5641.
- Zu, H.X. and Schut, H.J. (1991) Sex difference in the formation and persistence of DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]-quinoline (IQ) in CDF1 mice. *Carcinogenesis*, **12**, 2163-2168.

*Table 1. Comparison of cooking conditions for fish and pork.*

<i>Samples</i>	<i><sup>a</sup>Fish</i>	<i>Pork</i>
Total weight (g)	1042	3500
Heating surface (cm <sup>2</sup> )	812	ND <sup>b</sup>
Total volume of soybean oil (ml)	60	180
Cooking time (min)	(5min × 4) <sup>c</sup>	(2min × 18)
Temperature of cooking process (°C)	180→150→250→180	180→150→250→180

a. White pomfret was used in this study.

b. ND: non-determined.

c. Four fish were cooked individually for 5 min, while 3500 g pork were separated into eighteen piles and cooked for 2 min per pile.

**Table 2. The amounts of airborne particulates and acetone extracts from frying fish and pork.**

<i>OSC</i>	<i>Airbone particulates</i>		<i>Acetone extracts *</i>	
	mg/m <sup>3</sup>	µg/g meat/min	mg/m <sup>3</sup>	µg/g meat/min
<b>Fish</b>	<b>450</b>	<b>21.6</b>	<b>382</b>	<b>18.3</b>
<b>Pork</b>	<b>1264</b>	<b>10.0</b>	<b>1115</b>	<b>8.8</b>

\* The ratio of acetone extraction were 85% and 88% separately in FOSC and POSC.

**Table 3. The distribution of direct mutagenicity of FOOSC purified by semi-preparative column.**

Fractions <sup>a</sup>	Retention time (min)	No. of revertants / plate (ratio of control) <sup>b</sup>	% of total mutagenicity
I	1 ~ 19	80 ± 7 (4.06)	0.31
II	20 ~ 27	25,100 ± 220 (1276.05)	99.09
III	28 ~ 70	151 ± 13 (7.68)	0.60

a. 1 mg FOOSC for each fraction from HPLC elution was used to test their direct mutagenicity in TA98 strain.

b. The control is refer to the spontaneous revertants of TA98 strain which were 20 ± 3.

**Table 4. The mutagenicity of FOSC in *S. typhimurium* TA98 and TA100 in the presence and absence of S9 mixtures.**

OSC ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	No. of revertants / plate			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
100	53 $\pm$ 7 (3.1) <sup>a</sup>	103 $\pm$ 5 (4.0)	181 $\pm$ 16 (1.7)	231 $\pm$ 13 (2.8)
500	82 $\pm$ 6 (4.8)	375 $\pm$ 4 (14.4)	179 $\pm$ 1 (1.7)	550 $\pm$ 19 (6.7)
1000	102 $\pm$ 11 (6.0)	435 $\pm$ 9 (16.7)	148 $\pm$ 37 (1.4)	411 $\pm$ 44 (5.0)
1500	125 $\pm$ 1 (7.4)	455 $\pm$ 14 (17.5)	210 $\pm$ 25 (2.0)	509 $\pm$ 57 (6.1)
Solvent control	17 $\pm$ 3	26 $\pm$ 3	106 $\pm$ 18	83 $\pm$ 27
Positive control <sup>b</sup>				
DNP	1133 $\pm$ 110	--- <sup>c</sup>	205 $\pm$ 43	---
B[a]P	---	135 $\pm$ 15	---	302 $\pm$ 55

a. Values were the ratio of the revertants induced by FOSC and the revertants of solvent control

b. 1 ng DNP and 25  $\mu\text{g}$  B[a]P were used to examined the direct and indirect mutagenicity.

c. "---" : not determined.

**Table 5. The recovery rate of PAHs purified through the Baker-10 column.**

PAHs	Recovery (%)			Mean±SD
	First exp.	Second exp.	Third exp.	
Anthracene	92.02	88.71	90.49	90.41 ± 1.66
Fluoranthene	90.22	93.56	93.22	92.33 ± 1.84
Pyrene	96.77	97.9	98.14	97.60 ± 0.73
B[a]A	89.90	85.23	91.05	88.73 ± 3.08
Chrysene	80.60	72.50	83.77	78.96 ± 5.81
B[b]FA	74.68	82.04	89.33	82.02 ± 7.33
B[a]P	91.71	92.23	92.78	92.24 ± 0.54
DB[a,h]A	87.93	83.53	89.99	87.15 ± 3.30
B[g,h,i]P	96.29	84.04	89.84	90.06 ± 6.13
Mean±SD	88.90 ± 7.15	86.64 ± 7.50	90.96 ± 3.8	88.83 ± 5.6

**Table 6. The amounts of PAHs in FOSC<sup>a</sup>.**

PAHs	ng / mg of FOSC	µg / per fish (260 g)	Relative <sup>b</sup> ratio	% of total PAHs
B[b]FA	319.18 ± 6.10	30.473 ± 0.581	1.72	22.68
Pyrene	288.60 ± 69.72	27.554 ± 6.218	1.55	20.51
FA	258.99 ± 34.25	24.727 ± 3.976	1.39	18.40
B[g,h,i]P	211.64 ± 42.50	20.206 ± 3.349	1.14	15.04
B[a]P	186.11 ± 0.66	17.769 ± 0.060	1.00	13.23
B[a]A	73.22 ± 8.12	6.991 ± 1.212	0.39	5.20
B[k]FA	69.48 ± 0.66	6.634 ± 0.760	0.41	4.94
<b>Total</b>	<b>1412.62 ± 99.22</b>	<b>134.354 ± 0.946</b>		

a. Values were means ± SD of three independent experiments.

b. The relative ratio was the ratio of counts between individual PAH and B[a]P.



**Table 7. The amounts of PAHs in POSC<sup>a</sup>.**

PAHs	ng / mg of POSC	µg / 100 g pork	Relative <sup>b</sup> ratio	% of total PAHs
Pyrene	39.96 ± 6.57	1.273 ± 0.283	6.43	49.44
B[b]FA	14.50 ± 2.15	0.461 ± 0.066	2.33	17.90
FA	12.52 ± 2.49	0.399 ± 0.081	2.02	15.50
B[a]P	6.20 ± 1.02	0.198 ± 0.029	1.00	7.69
B[g,h,i]P	5.16 ± 0.85	0.164 ± 0.026	0.83	6.37
B[a]A	1.50 ± 0.17	0.048 ± 0.007	0.24	1.86
B[k]FA	1.01 ± 0.16	0.032 ± 0.005	0.16	1.24
<b>Total</b>	<b>82.43 ± 4.79</b>	<b>2.575 ± 0.156</b>		

a. Values were means ± SD of three independent experiments.

b. The relative ratio was the ratio of counts between individual PAH and B[a]P.

**Table 8. The DNA adduct levels in calf thymus DNA<sup>a</sup> induced by different PAHs , FOSC , and FOSC-B in presence of S9 mix.**

Samples	DNA adduct levels / 10 <sup>8</sup> nucleotides
B[b]FA	504.46 ± 25.70
pyrene	18.29 ± 3.08
FA	12.30 ± 2.97
B[g,h,i]P	77.10 ± 5.43
B[a]P	3882.80 ± 64.89
B[a]A	3583.04 ± 201.37
Anth	5.52 ± 1.33
chrysene	1298.38 ± 172.17
DB[a,h]A	407.41 ± 31.88
Mixed PAHs <sup>b</sup>	1981.16 ± 346.10
FOSC	37.81 ± 7.47
FOSC-B	117.89 ± 11.42

- a. 0.5 mg calf thymus DNA was used to treat with various PAHs (50 µM), FOSC (0.5 mg), and FOSC-B (0.5 mg) for 3 hrs.
- b. Mixed PAHs were the mixtures of nine PAH standards and their ratio were according to the PAHs ratio in FOSC.

**Table 9. The PAHs-DNA adduct levels induced by FOOSC in CL-3<sup>a</sup> cells.**

Sample	Dose	DNA adduct levels / 10 <sup>8</sup> nucleotides <sup>b</sup>		
		Spot1	DRZ . <sup>c</sup>	Total
FOOSC	0.5 mg	6.96 ± 1.36	5.58 ± 0.81	12.54 ± 2.17
FOOSC	1 mg	17.52 ± 3.51	11.80 ± 0.39	29.32 ± 3.9
FOOSC-B	0.5 mg	24.86 ± 0.2	11.58 ± 0.59	36.44 ± 0.79
FOOSC-B	1 mg	66.65 ± 0.83	31.52 ± 2.23	98.16 ± 3.05
DMSO	50 µl	ND <sup>d</sup>	ND	ND

a. CL-3 cells were treated with FOOSC or FOOSC-B for 24 hrs.

b. Values were means ± SD from three independent experiments.

c. DRZ. = diagonal radioactive zone.

d. ND: not detected.

**Table 10. The DNA adduct levels induced by different PAHs standard in CL-3 cells.**

PAH <sup>a</sup>	DNA adduct levels / 10 <sup>8</sup> nucleotides <sup>b</sup>
B[ <i>b</i> ]FA	29.76 ± 1.67
pyrene	ND
FA	ND
B[ <i>g,h,i</i> ]P	ND
B[ <i>a</i> ]P	81.97 ± 1.37
B[ <i>a</i> ]A	15.23 ± 2.18
Anth	ND
chrysene	ND
DB[ <i>a,h</i> ]A	7.78 ± 1.1
DMSO	ND

a. 2 μM of each PAH was used to treat with CL-3 cells for 24 hrs.

b. Values were means ± SD of three independent experiments.

c. ND: not detected.

**Table 11. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on the DNA adduct levels induced by FOXC in CL-3 cells.**

Sample <sup>a</sup>	The conc. of 17 $\beta$ -estradiol (ng/ml)	DNA adduct levels <sup>b</sup> /10 <sup>8</sup> nucleotides	PC(%) <sup>c</sup>
FOXC	0	30.22 $\pm$ 2.16	100
FOXC	0.05	38.77 $\pm$ 2.67	129.61 $\pm$ 3.98
FOXC	0.15	64.84 $\pm$ 6.63	214.29 $\pm$ 9.26
FOXC	0.3	72.75 $\pm$ 6.73	240.33 $\pm$ 9.74
-----			
B[a]P	0	83.37 $\pm$ 2.64	100
B[a]P	0.05	105.93 $\pm$ 25.35	124.91 $\pm$ 26.52
B[a]P	0.15	110.14 $\pm$ 7.77	131.80 $\pm$ 17.83
B[a]P	0.3	62.84 $\pm$ 2.32	74.39 $\pm$ 4.79
-----			
B[b]FA	0	29.10 $\pm$ 1.80	100
B[b]FA	0.05	36.65 $\pm$ 0.37	126.27 $\pm$ 12.28
B[b]FA	0.15	43.26 $\pm$ 1.78	148.73 $\pm$ 6.84
B[b]FA	0.3	46.73 $\pm$ 0.35	160.67 $\pm$ 12.49

- a. 1 mg FOXC, 2  $\mu$ M B[a]P, and 2 $\mu$ M B[b]FA were used to treat with CL-3 cells for 24 hrs .
- b. Values were means  $\pm$  SD Of three independent experiments.
- c. PC(%) : percent of control = (the DNA adduct levels induced by the sample in the presence of 17 $\beta$ -estradiol) / (the DNA adduct levels induced by the sample without 17 $\beta$ -estradiol)  $\times$  100%.

**Table 12-1. MDA formed from calf thymus DNA<sup>a</sup> treated with FOSC and FOSC-B by TBA assay .**

Sample		A532(nm) <sup>b</sup>	Ratio of control
<u>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(mM)</u>	<u>ascorbate(0.2mM)</u>		
-	-	0.0200 ± 0.0007	1.0
0.5	-	0.0465 ± 0.0008	2.3
-	+	0.1240 ± 0.0012	6.2
0.5	+	0.1930 ± 0.0021	9.7
1.0	+	0.2060 ± 0.0098	10.3
10.	+	0.4170 ± 0.0330	20.9
<u>FOSC#(mg)</u>	<u>S9 mix.</u>		
-	+	0.0405 ± 0.0007	1.0
0.05	+	0.0915 ± 0.0190	2.3
0.10	+	0.0965 ± 0.0150	2.4
0.50	+	0.1340 ± 0.0260	3.3
1.00	+	0.2200 ± 0.0130	5.4
1.00	+(without calf thymus DNA)	0.0410 ± 0.0060	1.0
0.50	+(without Cu <sup>2+</sup> )	0.1190 ± 0.0130	2.9
1.00	+(without Cu <sup>2+</sup> )	0.1960 ± 0.0050	4.8
0.05	-	0.0417 ± 0.0070	2.1
0.10	-	0.0488 ± 0.0090	2.4
0.50	-	0.1238 ± 0.0070	6.2
1.00	-	0.2166 ± 0.0070	10.8
<u>FOSC-B(mg)</u>	<u>S9 mix.</u>		
0.05	+	0.0760 ± 0.0028	1.9
0.10	+	0.0810 ± 0.0014	2.0
0.50	+	0.1170 ± 0.0014	2.9
1.00	+	0.1565 ± 0.0021	3.9

**Table 12-2. (continued)**

Sample		A532(nm)	Ratio of control
<u>B[a]P(<math>\mu</math>M)</u>	<u>S9 mix.</u>		
<b>0.10</b>	+	<b>0.0890 <math>\pm</math> 0.0014</b>	<b>2.2</b>
<b>1.00</b>	+	<b>0.0865 <math>\pm</math> 0.0007</b>	<b>2.1</b>
<b>10.0</b>	+	<b>0.0705 <math>\pm</math> 0.0014</b>	<b>1.7</b>
<b>100.</b>	+	<b>0.0990 <math>\pm</math> 0.0099</b>	<b>2.4</b>
-----			
<u>B[b]FA(<math>\mu</math>M)</u>	<u>S9 mix.</u>		
<b>0.10</b>	+	<b>0.0890 <math>\pm</math> 0.0010</b>	<b>2.2</b>
<b>1.00</b>	+	<b>0.0900 <math>\pm</math> 0.0020</b>	<b>2.2</b>
<b>10.0</b>	+	<b>0.0895 <math>\pm</math> 0.0021</b>	<b>2.2</b>
<b>100.</b>	+	<b>0.0885 <math>\pm</math> 0.0007</b>	<b>2.2</b>
-----			
<u>FA(<math>\mu</math>M)</u>	<u>S9 mix.</u>		
<b>0.10</b>	+	<b>0.0880 <math>\pm</math> 0.0012</b>	<b>2.2</b>
<b>1.00</b>	+	<b>0.0890 <math>\pm</math> 0.0014</b>	<b>2.2</b>
<b>10.0</b>	+	<b>0.0845 <math>\pm</math> 0.0021</b>	<b>2.1</b>
<b>100.</b>	+	<b>0.0880 <math>\pm</math> 0.0014</b>	<b>2.2</b>
-----			
<u>Mixed PAHs(<math>\mu</math>g)<sup>c</sup></u>	<u>S9 mix.</u>		
<b>0.57</b> (equaled 0.5mg FOOSC)	+	<b>0.0550 <math>\pm</math> 0.0100</b>	<b>1.4</b>
<b>1.15</b> (equaled 1.0mg FOOSC)	+	<b>0.0660 <math>\pm</math> 0.0090</b>	<b>1.6</b>
<b>5.70</b> (equaled 5.0mg FOOSC)	+	<b>0.0520 <math>\pm</math> 0.0170</b>	<b>1.3</b>
<b>11.5</b> (equaled 10.mg FOOSC)	+	<b>0.0610 <math>\pm</math> 0.0140</b>	<b>1.5</b>

- a. 250  $\mu$ g calf thymus DNA was used to treat with FOOSC and FOOSC-B in the presence of 100  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> and 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- b. All values were means  $\pm$  SD of three independent experiments.
- c. Mixed PAHs were the mixtures of nine PAH standards and their ratio were according to the PAHs ratio in FOOSC.

**Table 13. The lipid peroxidation of FOOSC in CL-3 cells evaluated by TBA assay<sup>a</sup>.**

Sample	A532(nm) <sup>b</sup>	Ratio of control		
<b>FOOSC(mg)</b>				
50µl of DMSO(solvent control)	<b>0.0330 ± 0.0010</b>	<b>1.0</b>		
<b>0.05</b>	<b>0.0433 ± 0.0012</b>	<b>1.3</b>		
<b>0.10</b>	<b>0.0577 ± 0.0015</b>	<b>1.7</b>		
<b>0.50</b>	<b>0.1540 ± 0.0111</b>	<b>4.7</b>		
<b>1.00</b>	<b>0.2213 ± 0.0136</b>	<b>6.7</b>		
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(mM)    ascorbate(0.2mM)    DMSO(50µl)</b>				
-	-	-	<b>0.0340 ± 0.0018</b>	<b>1.0</b>
-	+	-	<b>0.0400 ± 0.0010</b>	<b>1.2</b>
<b>0.5</b>	+	-	<b>0.0431 ± 0.0021</b>	<b>1.3</b>
<b>10.</b>	+	-	<b>0.1150 ± 0.0070</b>	<b>3.4</b>
<b>10.</b>	+	+	<b>0.0507 ± 0.0055</b>	<b>1.5</b>

a. The CL-3 cells ( $1 \times 10^6$  cells / ml) were put into a glass culture tubes and treated with various doses of FOOSC for 1 hr.

b. All values were means  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Table 14. The amounts of authentic malondialdehyde (MDA)-DNA adduct\*.**

Nucleotide	MDA-DNA adduct levels / 10 <sup>8</sup> nucleotides
dGTP	866.52
dATP	514.59
dCTP	743.04
calf thymus DNA	264.67

\* 10 mg of each free nucleotides and calf thymus DNA were treated with 0.01mole 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) according to the method of Vaca et al.,(Carcinogenesis, 13: 593-599, 1992).

**Table 15. The MDA-DNA adducts in CL-3 cells treated with FOSC<sup>a</sup> for different time periods.**

Sample	Time (hr)	MDA-DNA adduct levels <sup>b</sup> / 10 <sup>8</sup> nucleotides
FOSC	0.5	8.08 ± 0.89
FOSC	1.0	6.47 ± 1.76
FOSC	2.0	15.75 ± 1.01
FOSC	4.0	13.66 ± 2.78
FOSC	10.	15.98 ± 1.02
FOSC	16.	18.03 ± 2.16
FOSC	20.	16.22 ± 0.68
FOSC	24.	15.78 ± 0.48
10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ascorbate(0.2mM)	1.0	11.27 ± 2.11

a. The CL-3 cells were treated with 0.5 mg FOSC in the presence of 0.1 mM Cu<sup>2+</sup>.

b. All values were means ± SD of three independent experiments.

**Table 16. The amounts of 8-OH deoxyguanosine in calf thymus DNA treated with ascorbate, B[a]P, and FOSe<sup>a</sup>.**

Sample	Phosphate buffer (250mM)	S9	8-OH dG (fmole/ $\mu$ g DNA)
<b>Ascorbate(mM)</b>			
0.02	+	-	<b>100.8</b>
0.1	+	-	<b>214.4</b>
0.5	+	-	<b>609.0</b>
1.0	+	-	<b>757.6</b>
10.	+	-	<b>965.2</b>
<hr/>			
<b>B[a]P(<math>\mu</math>M)</b>			
1	-	+	<b>33.25</b>
5	-	+	<b>12.8</b>
10	-	+	<b>31.9</b>
50	-	+	<b>10.4</b>
100	-	+	<b>36.6</b>
200	-	+	<b>12.2</b>
500	-	+	<b>15.6</b>
<hr/>			
<b>FOSe(mg)<sup>b</sup></b>			
0.05	-	+	<b>379.5</b>
0.1	-	+	<b>527.4</b>
0.2	-	+	<b>806.2</b>
0.5	-	+	<b>858.8</b>
1.0	-	+	<b>911.9</b>
2.0	-	+	<b>1059.8</b>

a. 200  $\mu$ g calf thymus DNA were treated with ascorbate, B[a]P, and FOSe in the presence of 50  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> for 2 hrs.

b. Correlation of amount of FOSe used and 8-OH dG induced was statistically significant (P<0.05).

**Table 17. The effects of ascorbate on the formation of PAH-DNA adducts induced by FOOSC and B[a]P in CL-3 cells<sup>a</sup>.**

Sample	Ascorbate (mM)	DTT (100 mM)	Cu <sup>2+</sup> (100µM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10mM)	DNA adduct levels /10 <sup>8</sup> nucleotides <sup>b</sup> (PC %) <sup>c</sup>
FOOSC (0.5 mg)					
+	-	-	-	-	31.16 ± 1.24 (100%)
+	5 mM	+	-	-	5.02 ± 3.40 (16.33±11.56%)
+	20 mM	+	-	-	5.97 ± 3.04 (19.36±10.53%)
+	100 mM	+	-	-	6.05 ± 1.97 (19.31± 5.54%)
+	200 mM	+	-	-	5.03 ± 0.98 (16.08±2.52%)
+	-	-	-	+	11.99 ± 8.34
+	0.2 mM	-	-	+	4.89 ± 3.59
+	0.2 mM	-	+	+	13.45 ± 0.35
B[a]P (0.2 µM)					
+	-	-	-	-	86.88 ± 3.55(100%)
+	5 mM	+	-	-	1.70 ± 2.34 (2.01±2.81%)
+	20 mM	+	-	-	2.36 ± 2.43 (2.77±2.90%)
+	100 mM	+	-	-	2.23 ± 2.85 (2.63±3.39%)
+	200 mM	+	-	-	2.04 ± 2.57 (2.24±2.81%)
+	-	-	-	+	3.24 ± 3.88
+	0.2 mM	-	-	+	4.94 ± 6.51
+	0.2 mM	-	+	+	5.86 ± 8.05

a. The CL-3 cells were treated with FOOSC or B[a]P for 24 hrs.

b. All values were means ± SD of three independent experiments.

c. PC means percent of control.

**Table 18. The effect of FOSC and FOSC-B on the p53 expression in CL-3 cells<sup>a</sup>.**

Sample	Percentage of p53 expression(%) <sup>b</sup>
<b>B[a]P (μM)</b>	
<b>0</b>	<b>60.5 ± 7.78</b>
<b>0.1</b>	<b>97.5 ± 0.70</b>
<b>0.5</b>	<b>44.0 ± 4.24</b>
<b>10.0</b>	<b>22.0 ± 4.24</b>
<b>B[b]FA (μM)</b>	
<b>0</b>	<b>60.5 ± 7.78</b>
<b>0.1</b>	<b>45.5 ± 2.12</b>
<b>0.5</b>	<b>23.0 ± 2.83</b>
<b>10.0</b>	<b>0.0 ± 0.0</b>
<b>FOSC (mg/2ml)</b>	
<b>0</b>	<b>60.5 ± 7.78</b>
<b>0.01</b>	<b>22.5 ± 4.94</b>
<b>0.1</b>	<b>14.5 ± 2.12</b>
<b>0.5</b>	<b>7.5 ± 2.12</b>
<b>1.0</b>	<b>1.0 ± 1.41</b>
<b>FOSC-B (mg/2ml)</b>	
<b>0</b>	<b>60.5 ± 7.78</b>
<b>0.01</b>	<b>45.5 ± 0.71</b>
<b>0.1</b>	<b>22.5 ± 2.12</b>
<b>0.5</b>	<b>21.5 ± 2.12</b>
<b>1.0</b>	<b>10. ± 1.41</b>

a. The CL-3 cells were treated with various amounts of PAHs or samples for 24 hrs. The level of p53 expression was detected by immunostaining.

b. These values were means ± SD of two independent experiments.

**Table 19. The effect of various treatment periods of FOSC on the p53 expression in CL-3 cells.**

Sample	Treated times(hrs)	Percentage of p53 expression(%)*	
<b>DMSO</b>	<b>4</b>	<b>32.0 ± 4.24</b>	
	<b>16</b>	<b>49.5 ± 0.71</b>	
	<b>24</b>	<b>60.5 ± 7.78</b>	
<b>FOSC</b>	<b>0.01 mg</b>	<b>4</b>	<b>40.0 ± 1.4</b>
		<b>16</b>	<b>41.0 ± 8.49</b>
		<b>24</b>	<b>22.5 ± 4.95</b>
	<b>0.1 mg</b>	<b>4</b>	<b>39.5 ± 4.95</b>
		<b>16</b>	<b>26.5 ± 4.97</b>
		<b>24</b>	<b>14.5 ± 2.12</b>
	<b>0.5 mg</b>	<b>4</b>	<b>25.5 ± 2.12</b>
		<b>16</b>	<b>15.5 ± 2.12</b>
		<b>24</b>	<b>7.5 ± 2.12</b>
	<b>1.0 mg</b>	<b>4</b>	<b>33.0 ± 7.07</b>
		<b>16</b>	<b>4.5 ± 2.12</b>
		<b>24</b>	<b>1.0 ± 1.41</b>

\* These values wer means±SD of two independent experiments.

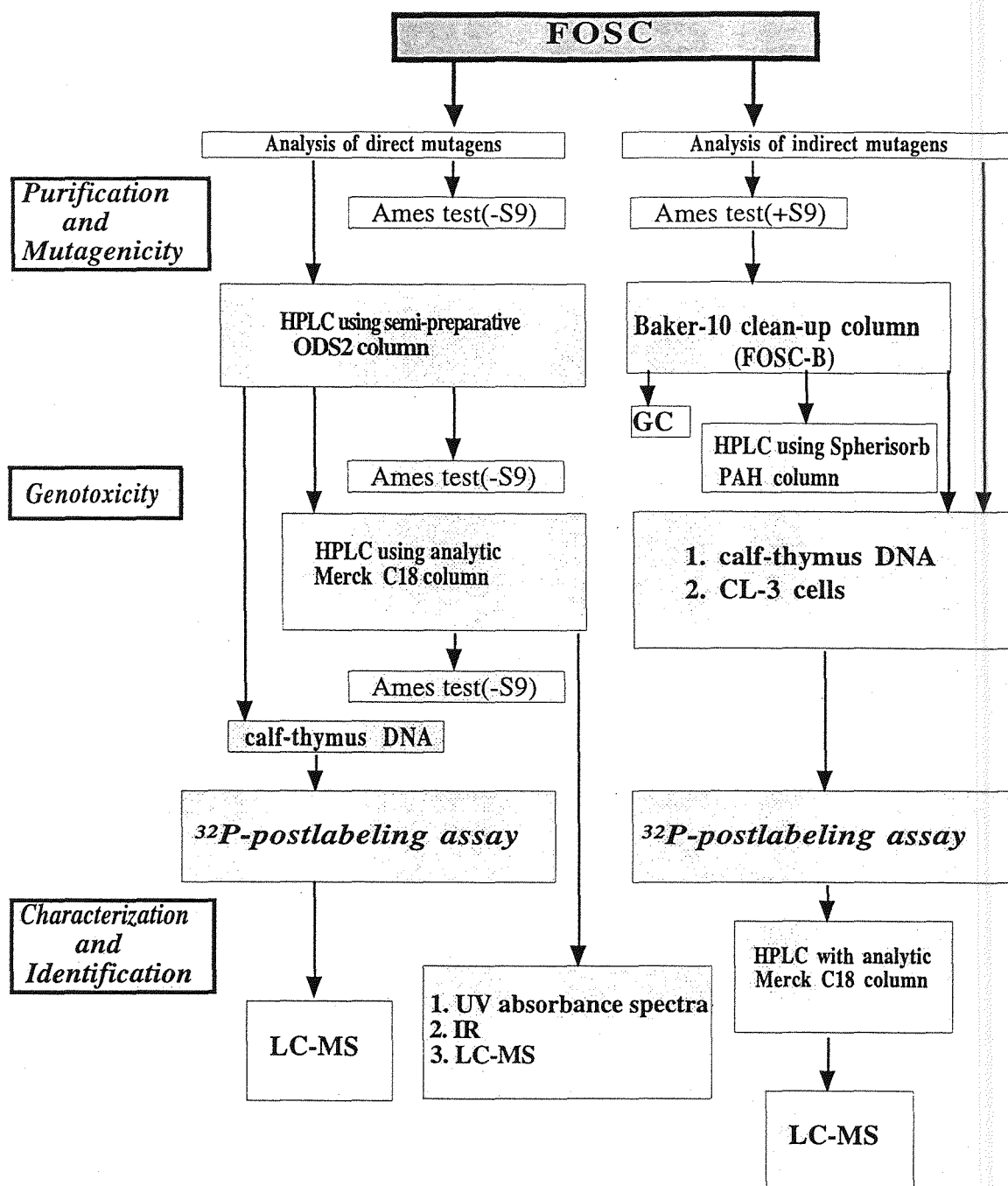
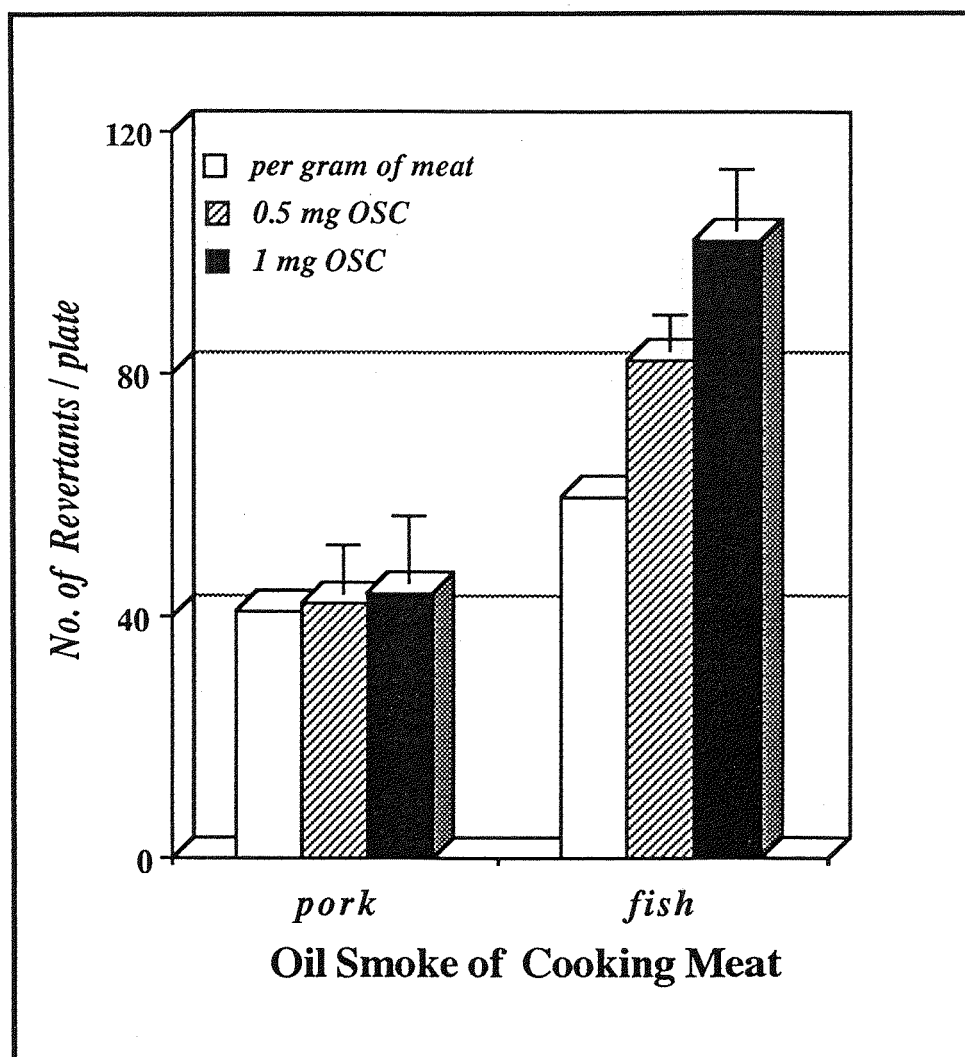
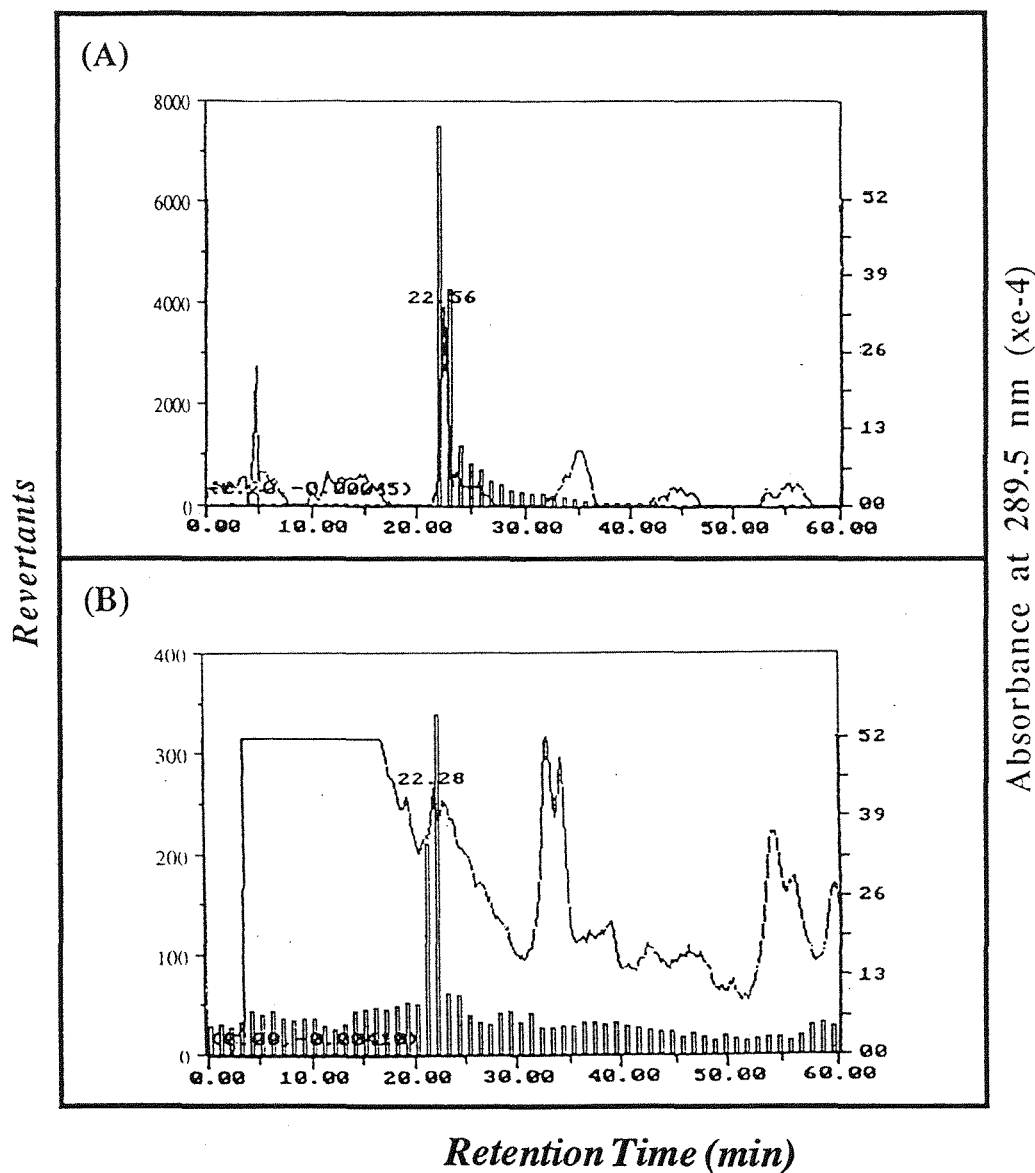


Fig. 1. The flow chart of purification and analysis for FOSC.

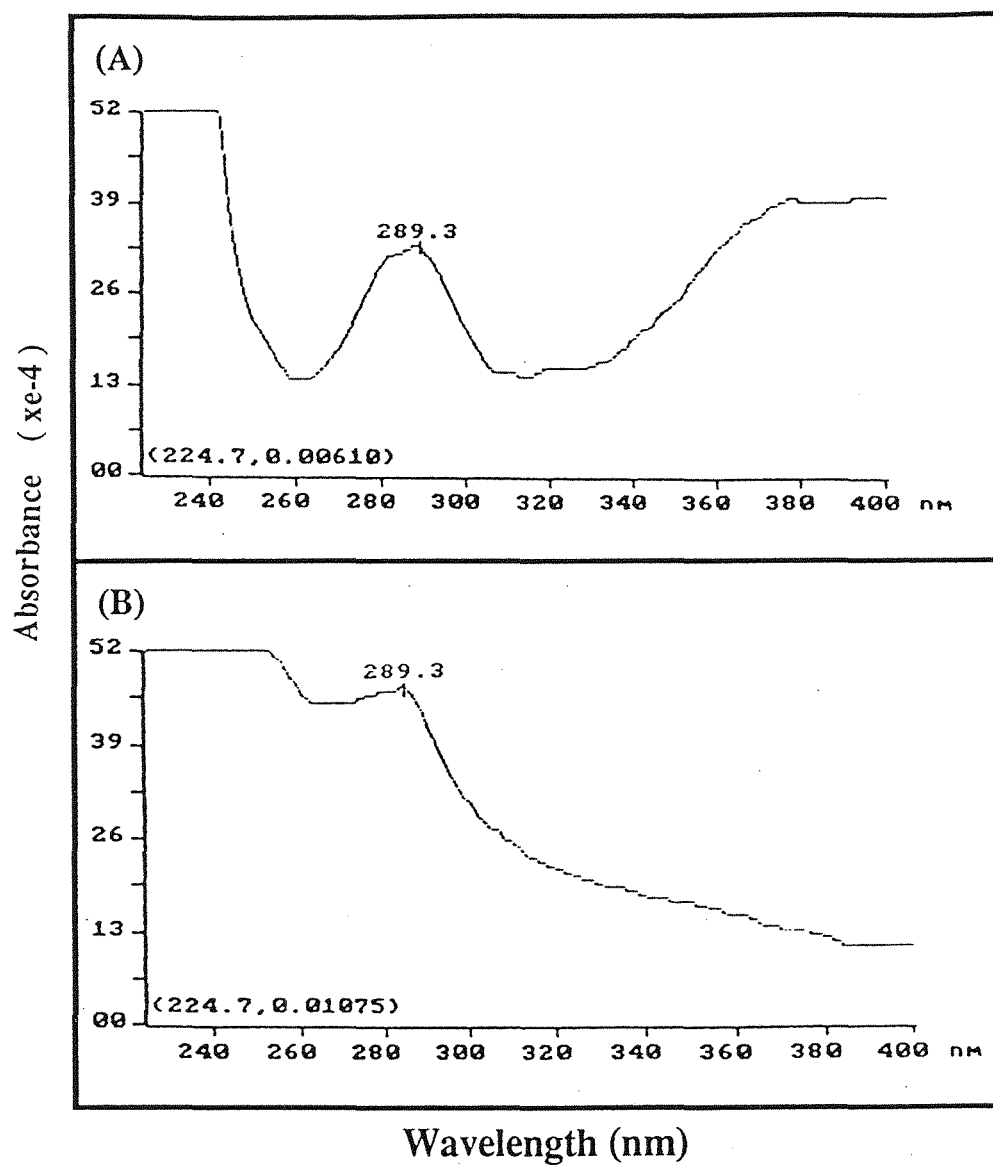


**Fig. 2.** The comparison of the direct mutagenicity of FOSC and POSC in *S. typhimurium* TA98. The difference between FOSC and POSC was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

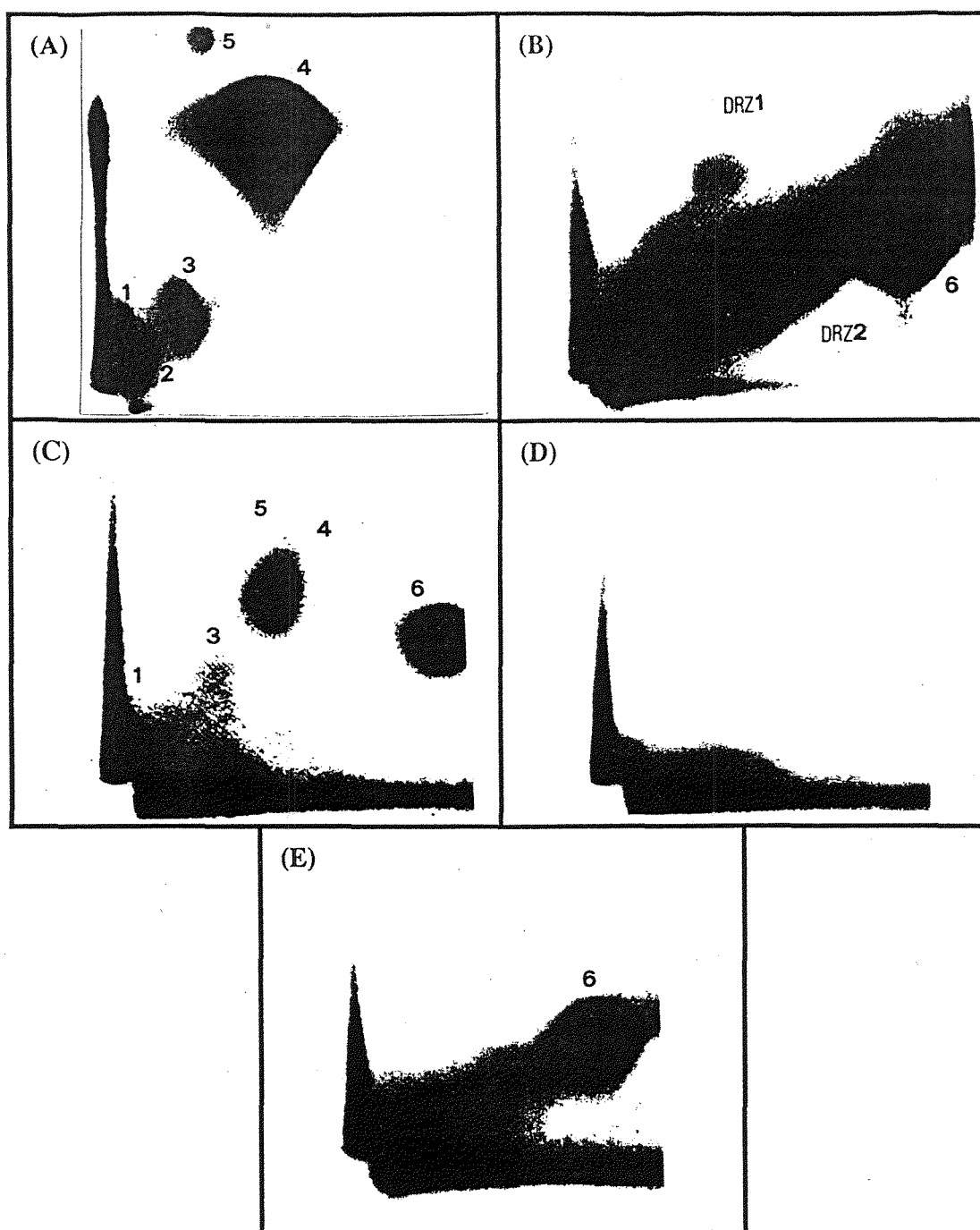




**Fig. 3.** The chromatogram and mutagenicity profiles of (A) 20 ng 1,6-DNP and (B) 1 mg FOOSC analyzed by HPLC ODS2 column. The mutagenicity of 1-min fraction was tested with *S. typhimurium* TA98 in the absence of S9 mixtures. The numbers of spontaneous revertants and revertants induced by 1ng 1,6-DNP were  $18 \pm 5$  and  $1105 \pm 52$ , respectively.



**Fig. 4. The UV absorbance spectra of (A)authentic 1,6-DNP and (B)FOSC analyzed by HPLC Spheris-ORS S10 ODS2 column and monitored with photodiode array detector.**



**Fig. 5.**  $^{32}\text{P}$ -postlabeling of 1,6-DNP-DNA adducts in calf-thymus DNA treated with (A) authentic  $30\ \mu\text{M}$  1,6-DNP, (B) 1 mg FOSC, (C) 0.5 mg purified FOSC from Spheris-ORS S10 ODS2 column, (D)  $30\ \mu\text{l}$  solvent control DMSO. The profile of 1,6-DNP-DNA adducts in CL-3 cells treated with 0.5 mg FOSC was shown in (E). 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 film. Films were exposed at  $-80^\circ\text{C}$  for 70 hrs.

Relative Abundance

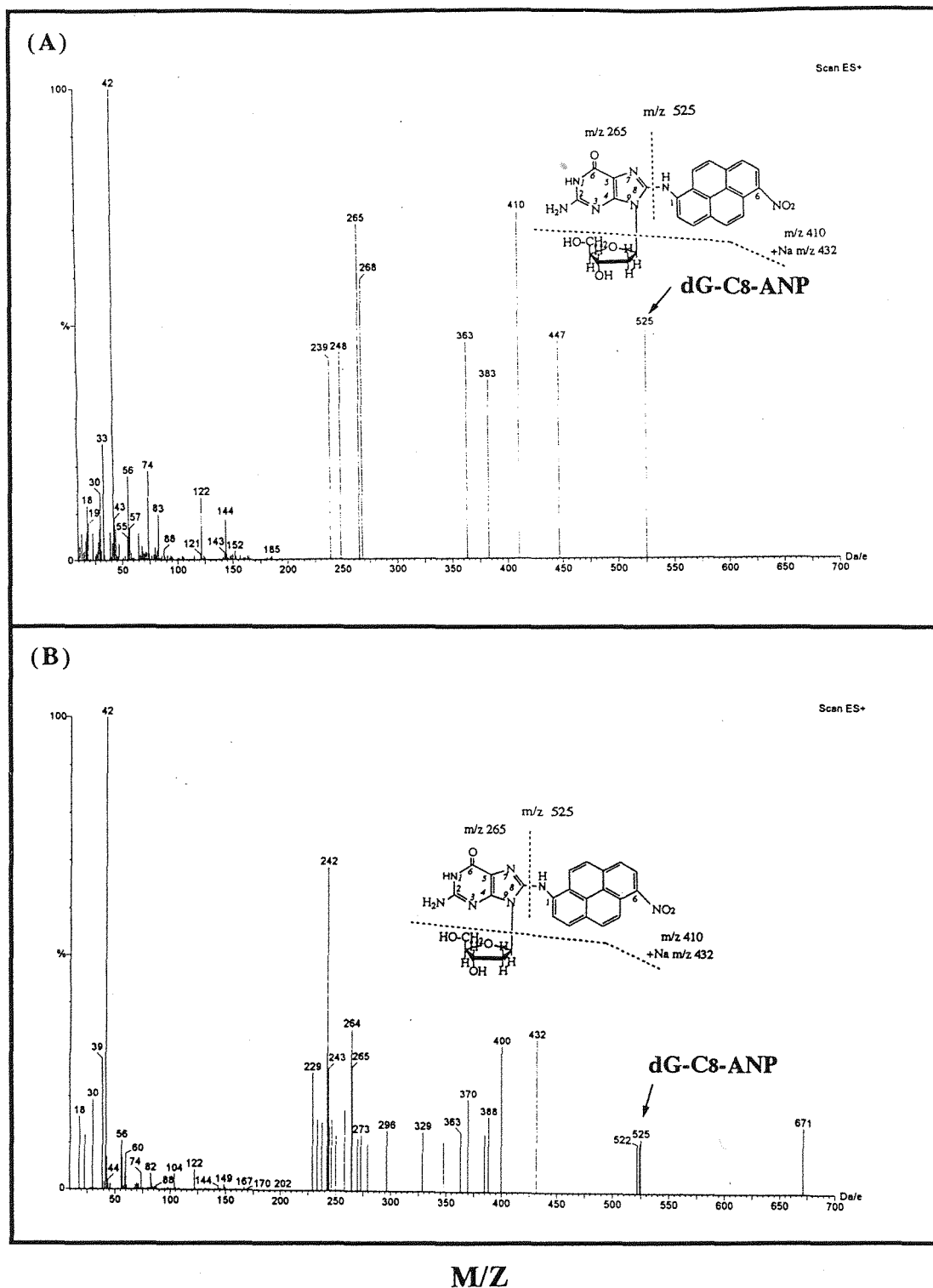
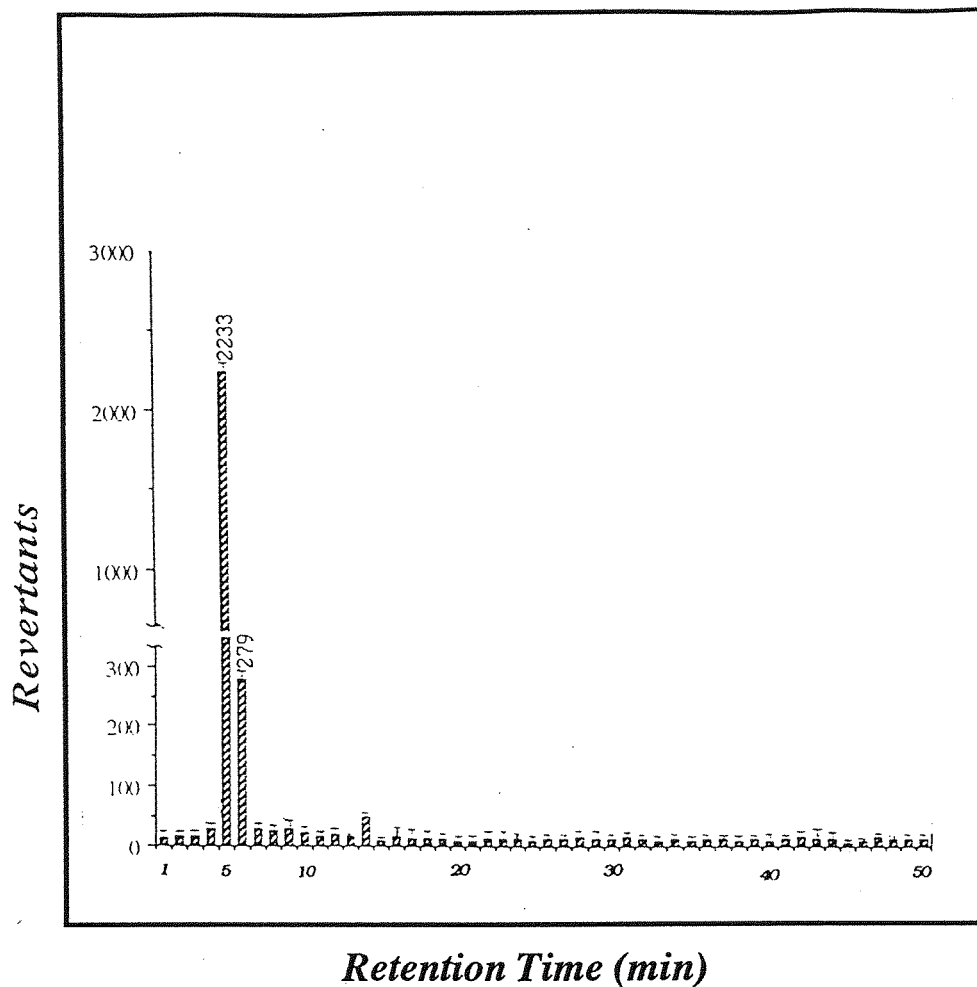
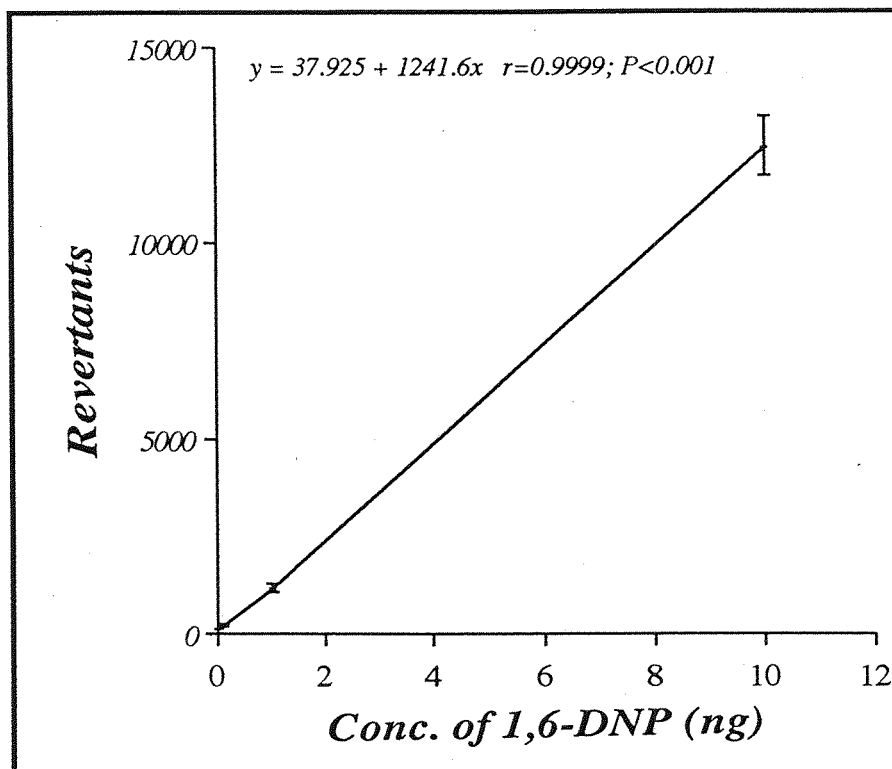


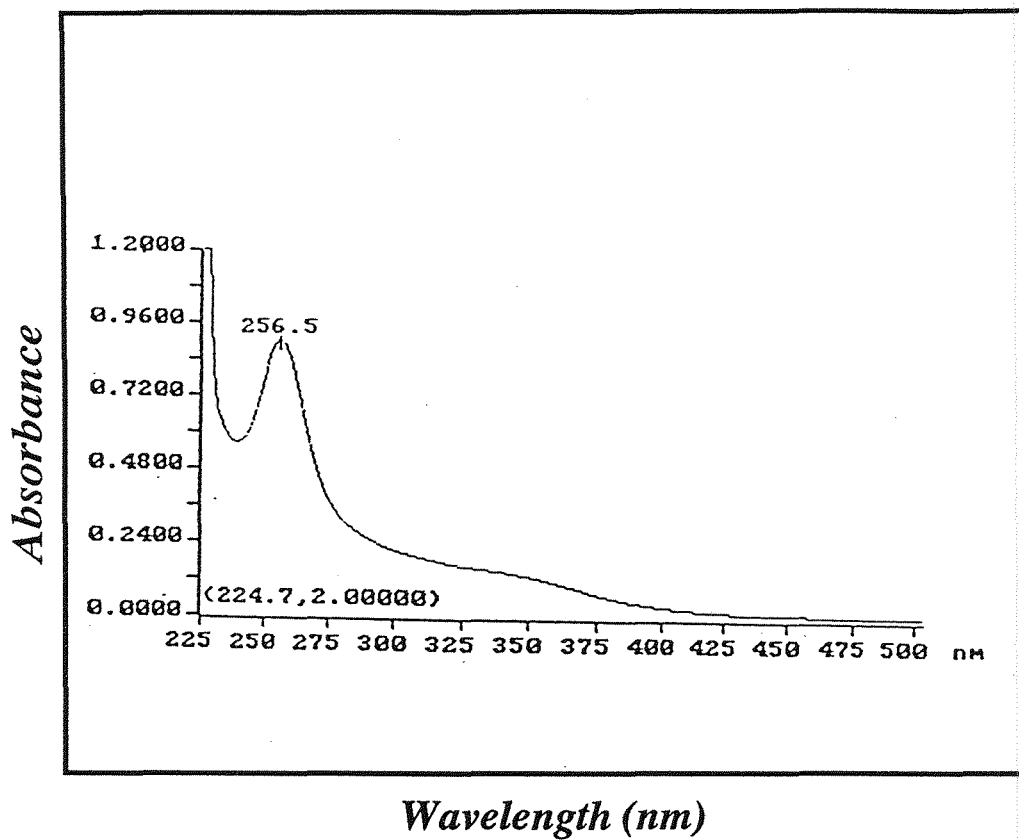
Fig. 6. The Electrospray MS spectrum of (A) 1,6-DNP-C<sup>8</sup>-dG adduct and (B) identified 1,6-DNP-DNA adduct from calf thymus DNA treated with FOXC.



**Fig. 7.** The mutagenicity of 1-min fraction of partially purified FOOSC (10  $\mu$ g) from an analytical RP-18 column tested with *S. typhimurium* TA98 in the absence of S9 mixtures. The numbers of spontaneous revertants and revertants induced by 1ng 1,6-DNP were  $20 \pm 3$  and  $1073 \pm 21$ , respectively.



**Fig. 8.** The dose-response mutagenicity of 1,6-DNP in *S.typhimurium* TA98 without S9 mixtures. The numbers of spontaneous revertants were  $20 \pm 3$ .



**Fig. 9.** The UV spectrum of the active fraction of FOSC from analytical RP-18 column monitored by photodiode array detector.

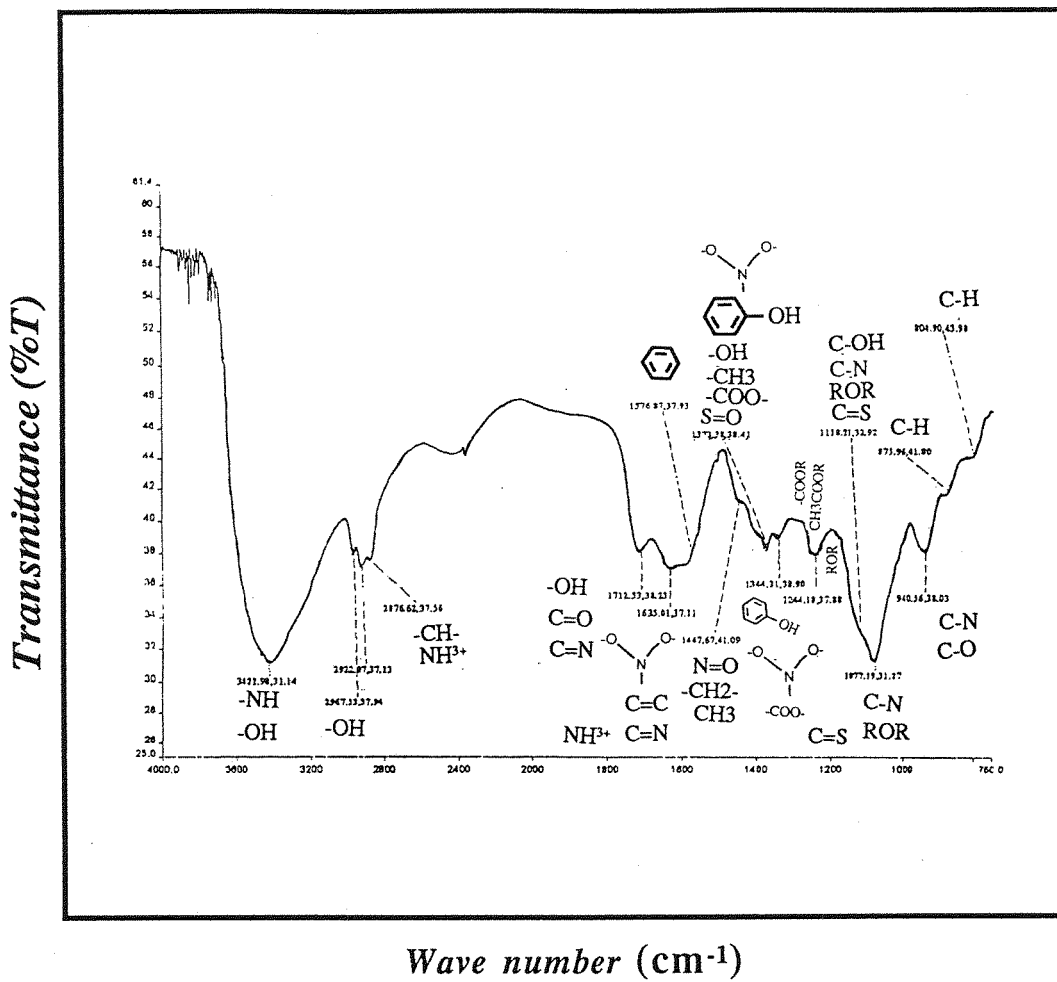


Fig. 10. The IR spectrum of the active fraction of FOSC from analytical RP-18 column analyzed by infrared spectra photometry.



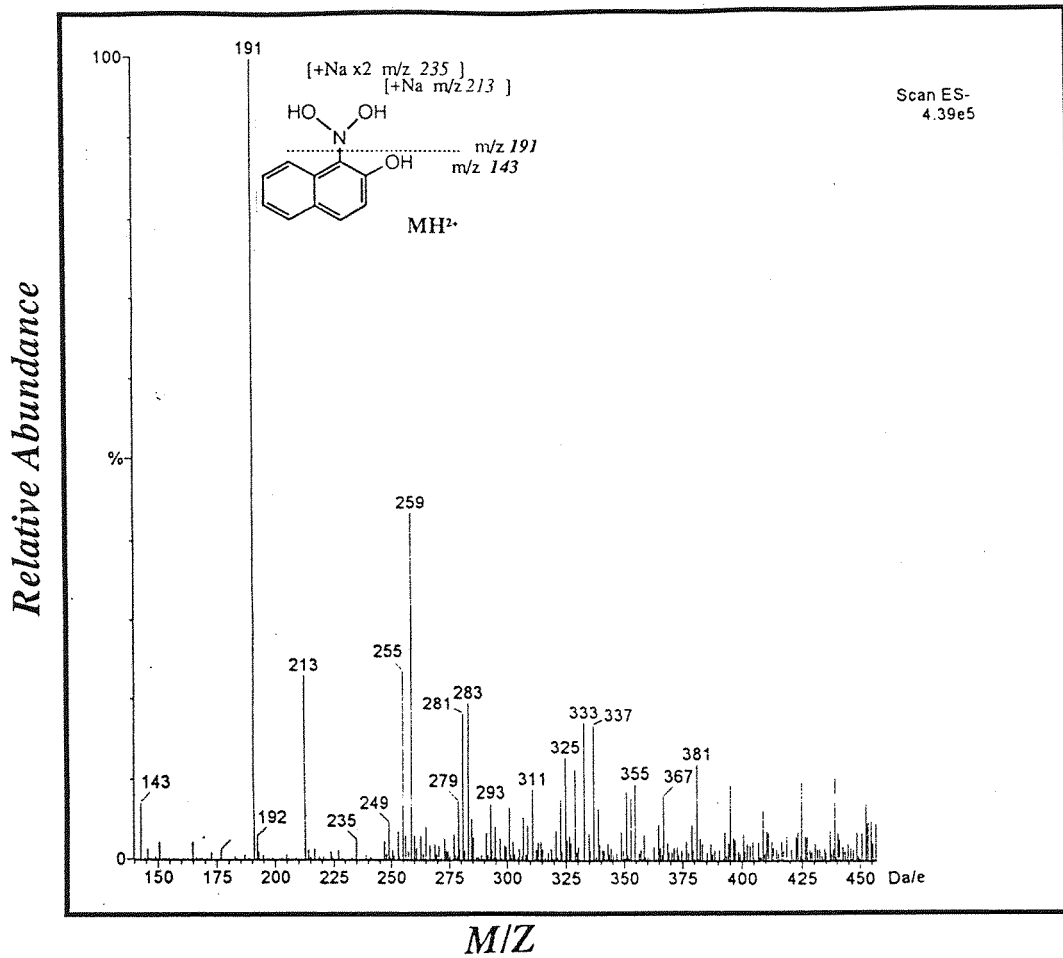
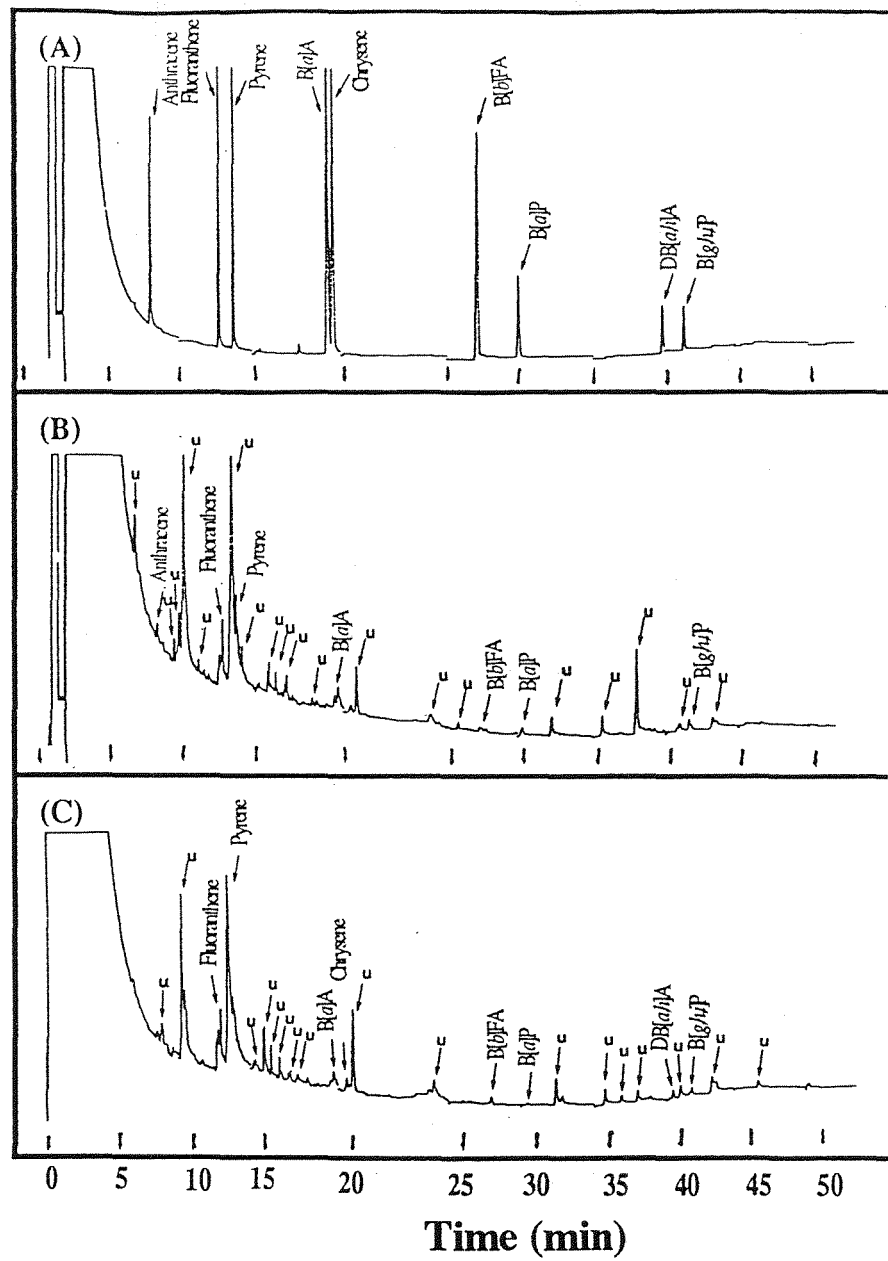
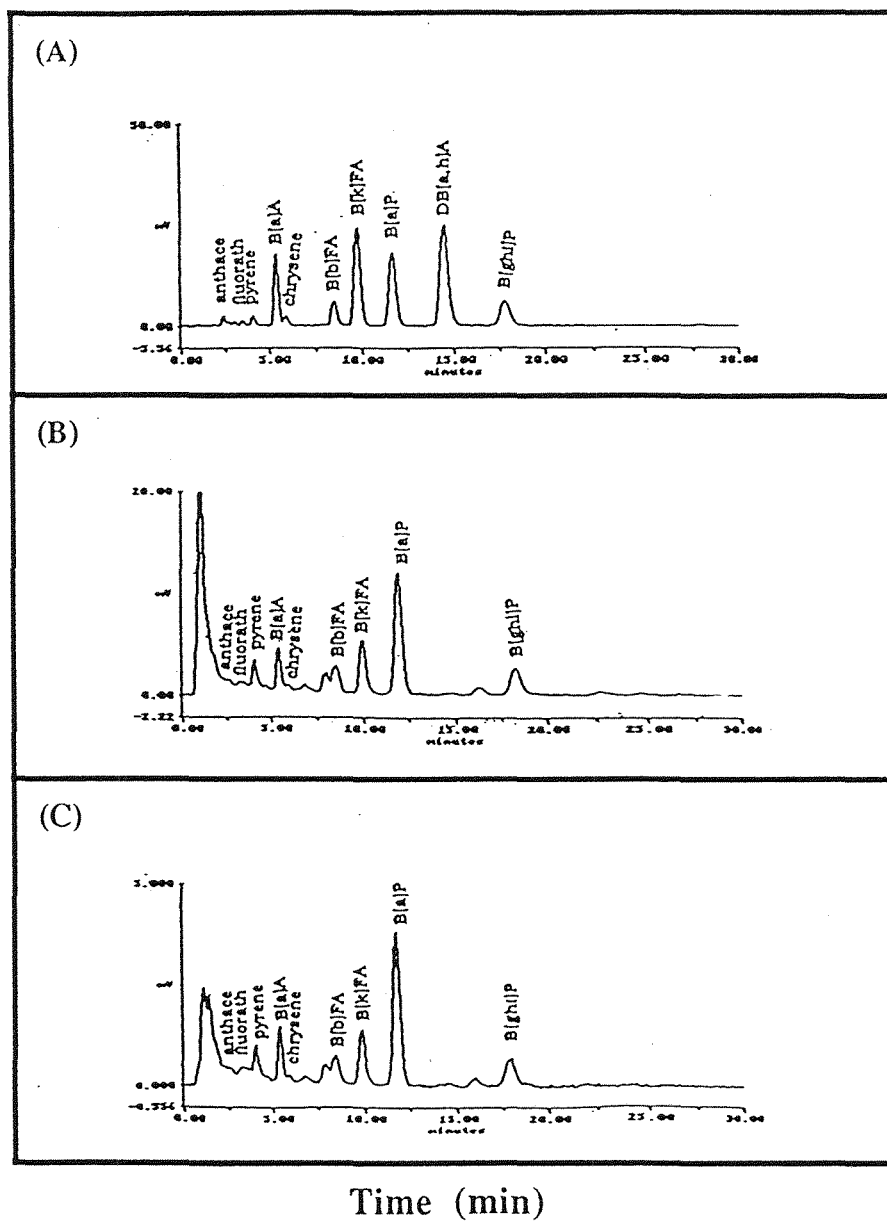


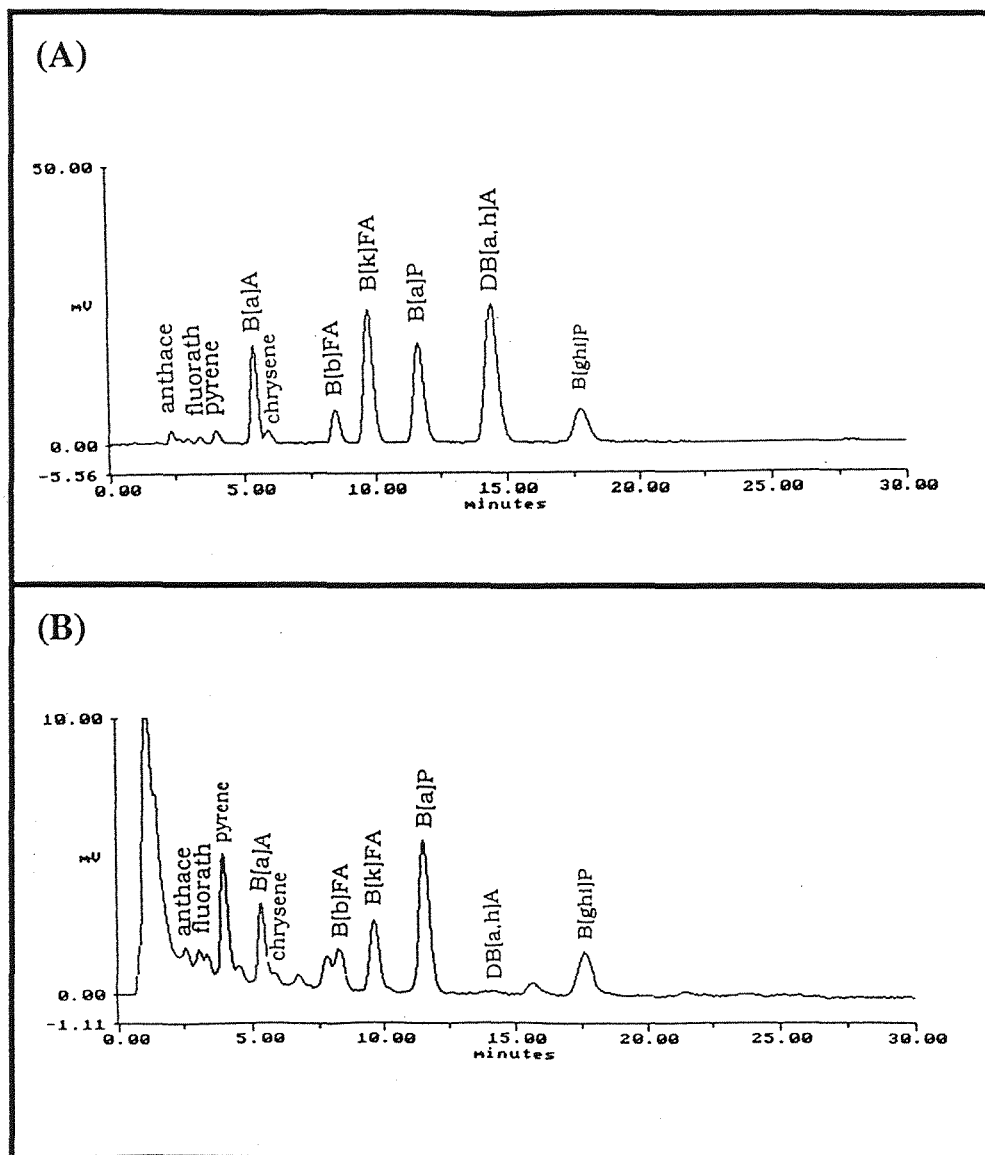
Fig. 11. The Electrospray Mass spectrum of the active fraction of FOSC from analytical RP-18 column.



**Fig. 12. The GC chromatograms of (A)standard PAHs , (B)FOSC-B and (C)POSC-B . u : unknown compound.**

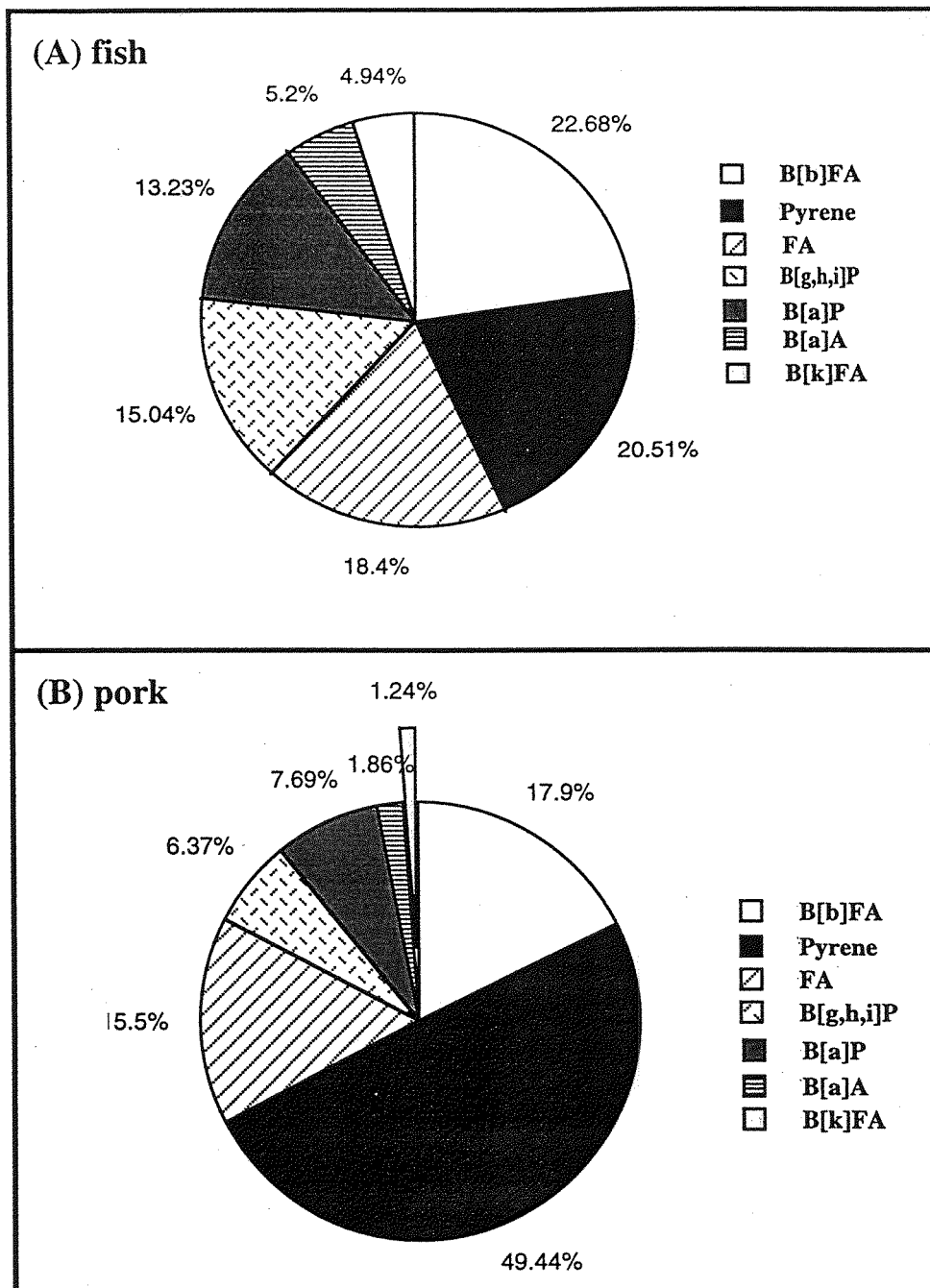


**Fig. 13. The HPLC profiles of (A) 10 PAHs standards, (B) FOSC and (C) FOSC-B.**

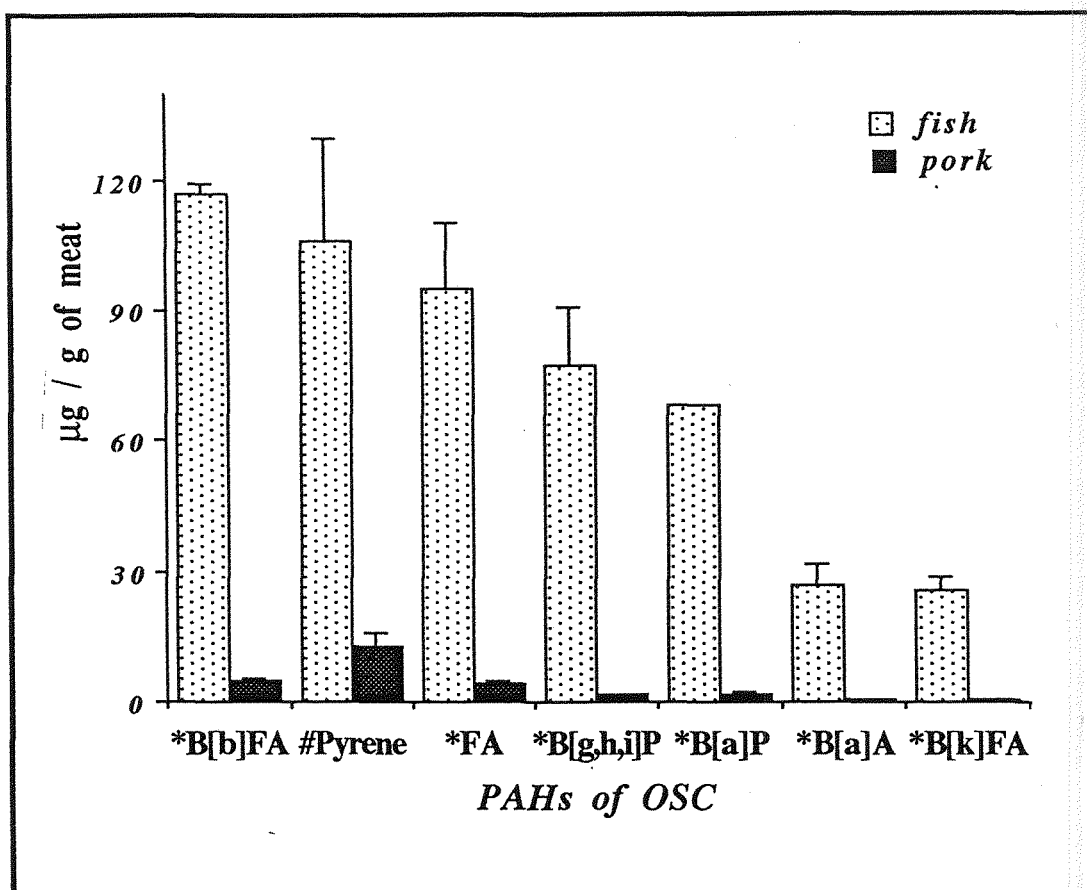


*Retention Time (min)*

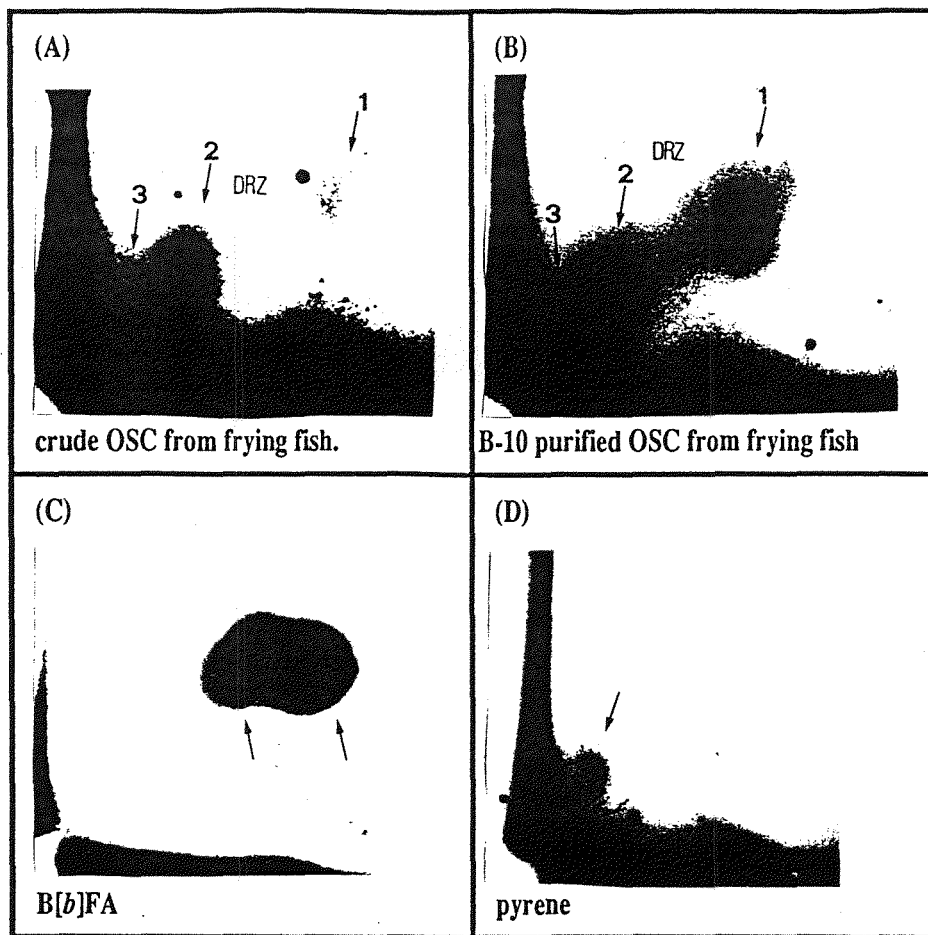
**Fig. 14. The HPLC profiles of (A) 10 PAHs standards and (B) POSC-B.**



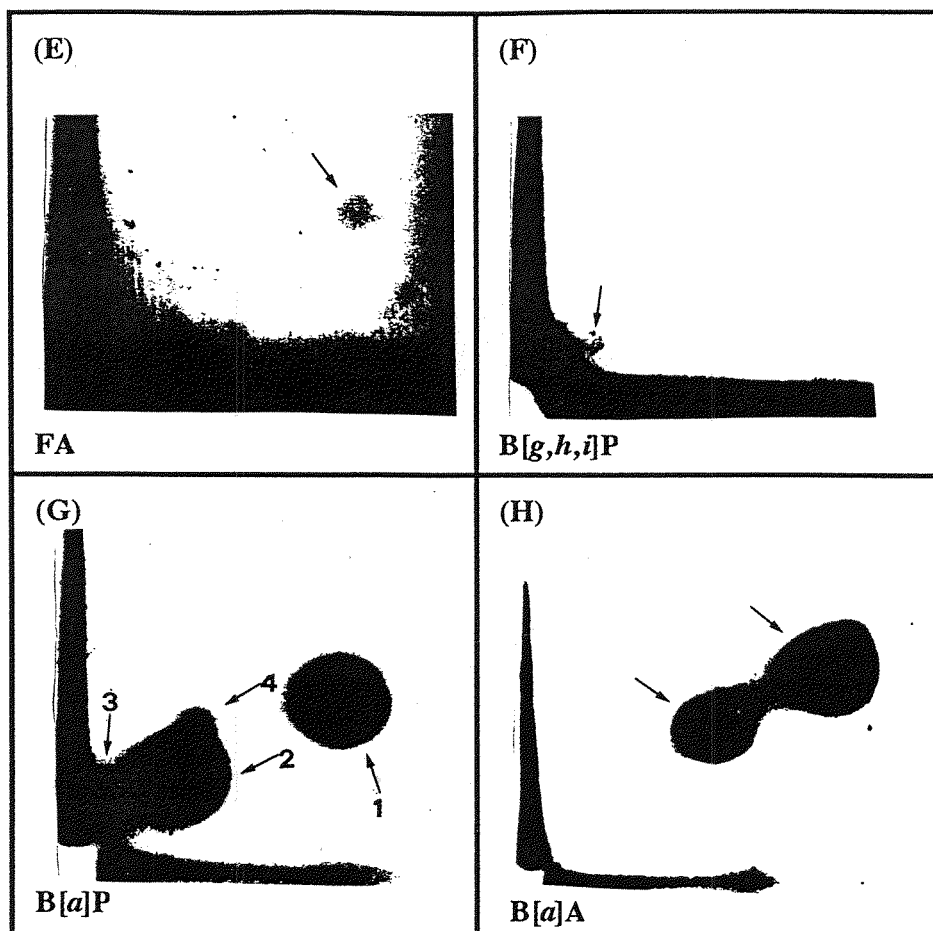
**Fig. 15. The distribution of individual PAH contents in (A) FOSC and (B)POSC .**



**Fig. 16. The comparison of the amounts of PAHs between the FOSC and POSC. The differences of the amount of which PAH between FOSC and POSC were statistically significant(\* $P < 0.001$ , # $P < 0.025$ ).**



**Fig. 17-1.**  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of DNA adducts in calf-thymus DNA with Aroclor-1254 induced rat liver S9 mix. treated separately with (A)0.5 mg FOOSC , (B)0.5 mg FOOSC-B , (C)50  $\mu\text{M}$  B[b]FA, and (D)pyrene. The major spots of the adducts were indicated by arrows.



**Fig. 17-2.**  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of DNA adducts in calf-thymus DNA with Aroclor-1254 induced rat liver S9 mix. treated separately with (E)  $50\ \mu\text{M}$  FA, (F) B[g,h,i]P, (G) B[a]P and (H) B[a]A. The major spots of the adducts were indicated by arrows.



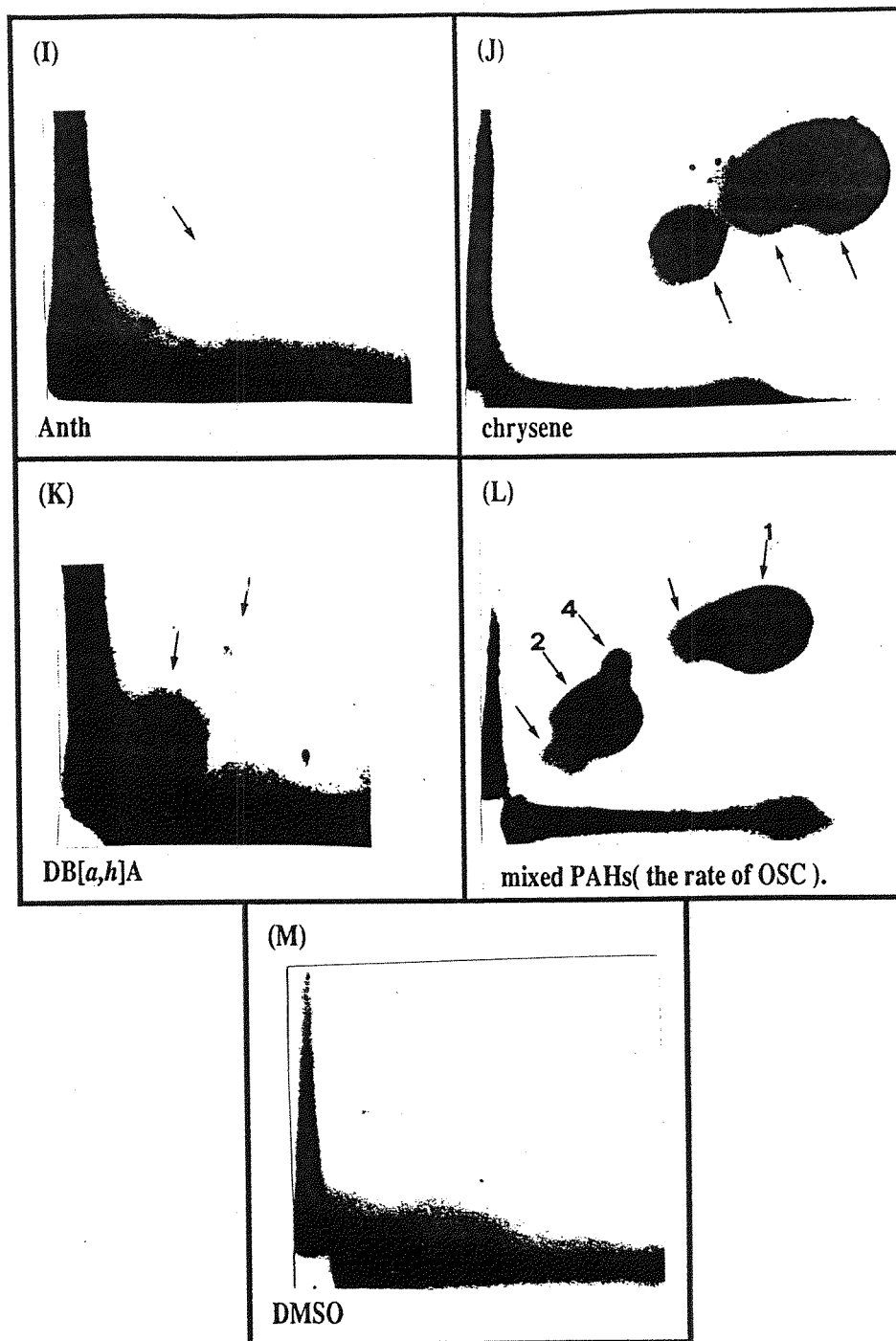
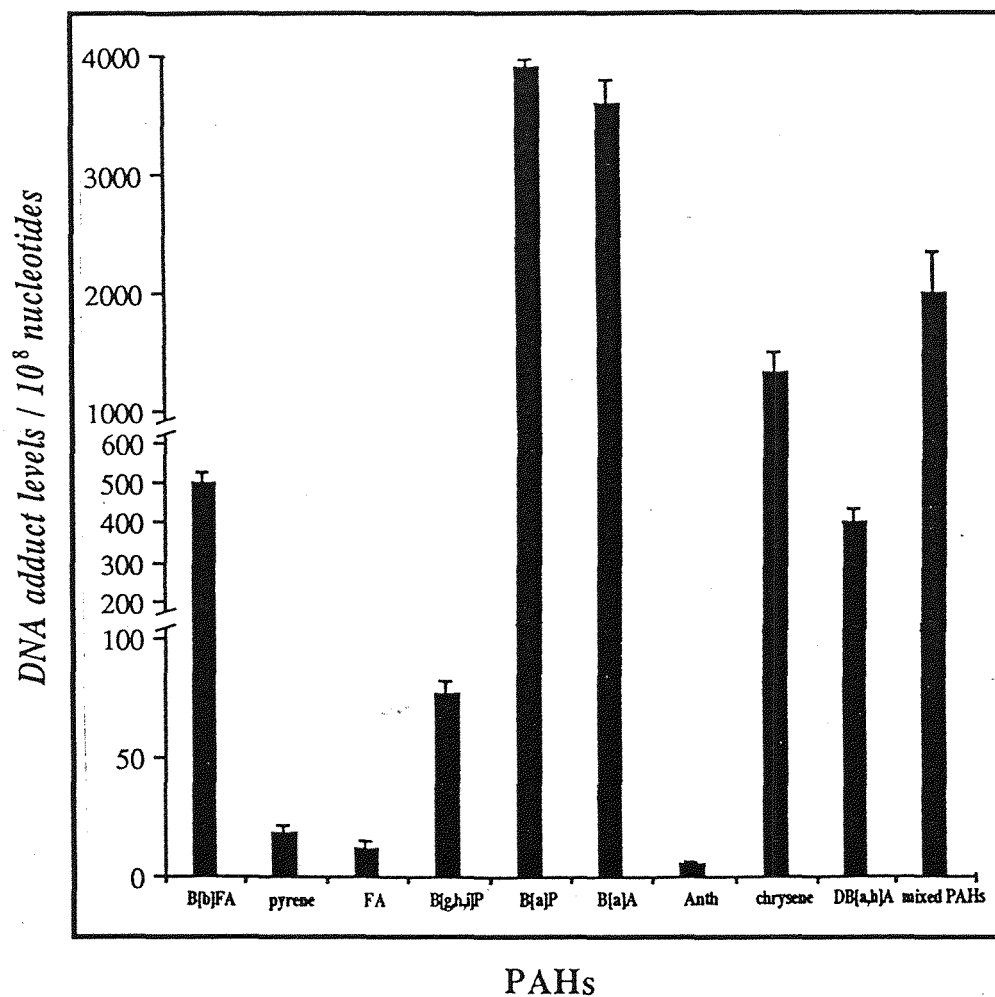
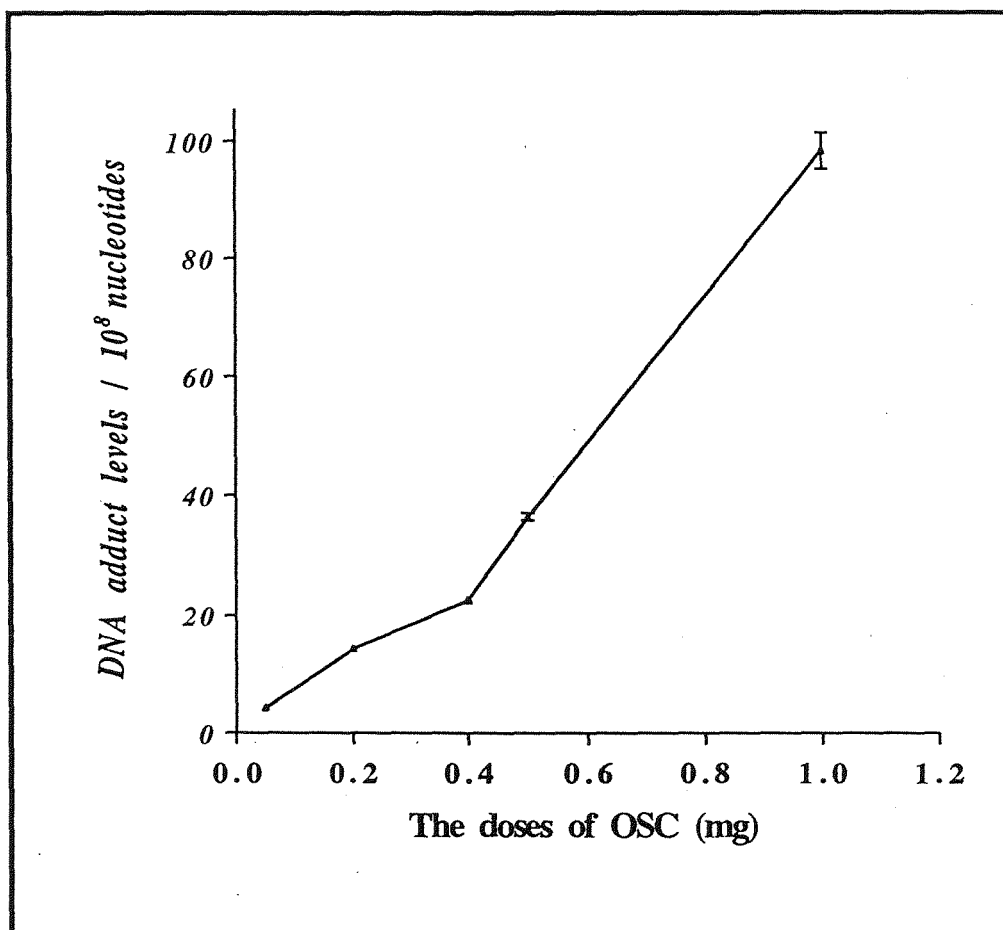


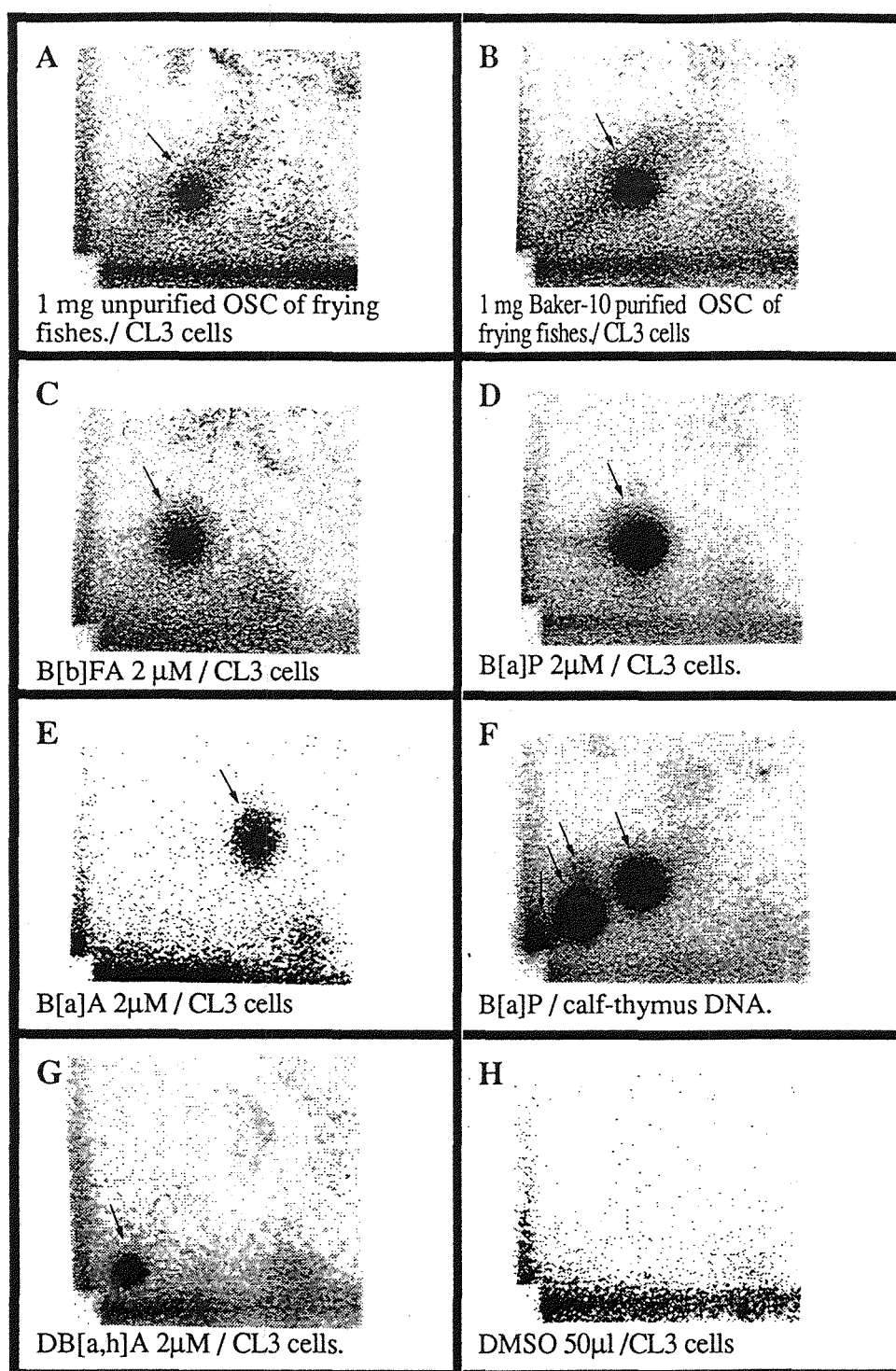
Fig. 17-3.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of DNA adducts in calf-thymus DNA with Aroclor-1254 induced rat liver S9 mix. separately treated with (I)  $50\ \mu\text{M}$  Anth , (J) chrysene , and (K) DB[a,h]A. The profile of DNA treated with mixed PAHs was shown in (L), The ratios of each PAH were B[b]FA : pyrene : FA : B[g,h,i]P : B[a]P : B[a]A = 24 : 22 : 19 : 16 : 14 : 5 , (M) was the DMSO control.



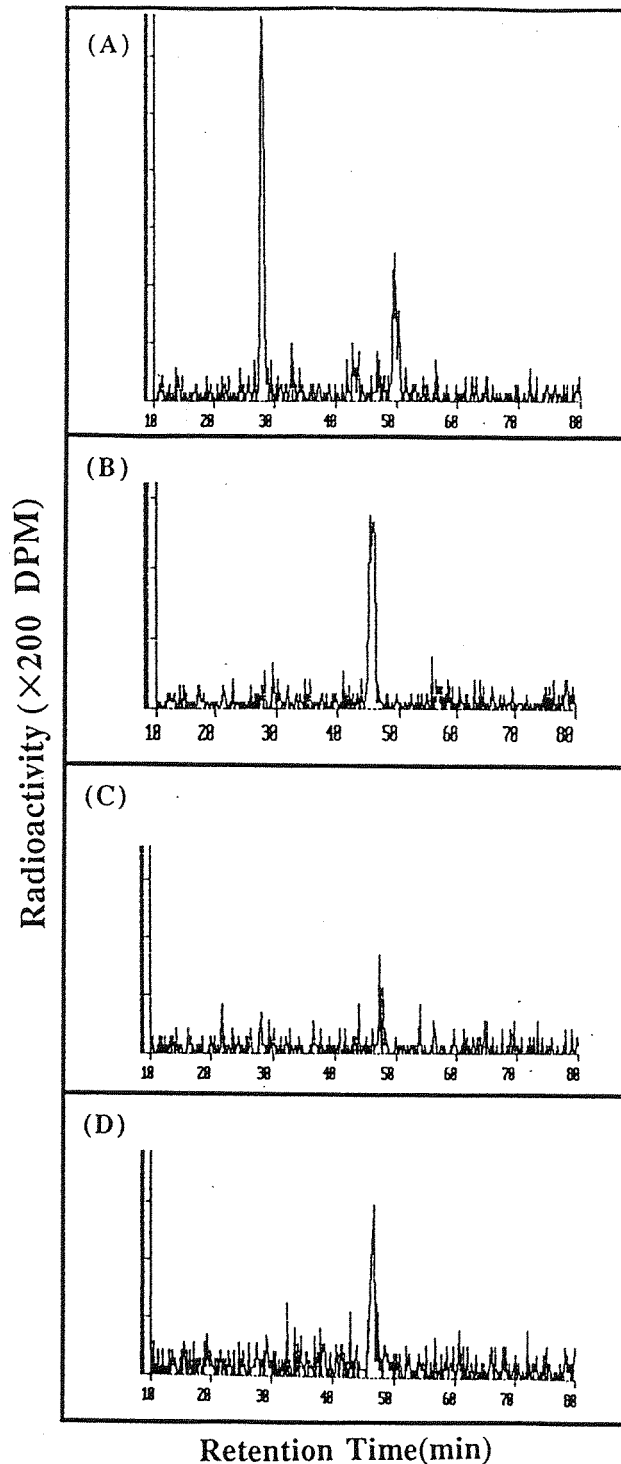
**Fig. 18.** The comparison of the DNA adduct levels induced by individual PAHs ( $50 \mu\text{M}$ ) in  $0.5 \text{ mg}$  of calf thymus DNA in the presence of S9 mixtures. The DNA adduct level differed significantly between each PAH treated group ( $P < 0.001$ ).



**Fig. 19.** The dose-dependent relation of PAH-adduct levels in CL-3 cells treated with different doses of FOSC. The correlation between the doses of OSC and DNA adduct level was statistically significant ( $r = 0.98$ ;  $P < 0.05$ ).



**Fig. 20.**  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of DNA adducts in CL-3 cells. (A) 1mg FOSC, (B) 1mg FOSC-B, (C) B[b]FA, (D) B[a]P, (E) B[a]A, and (G) DB[a,h]A, B[a]P-DNA adducts in calf-thymus DNA with Aroclor-1254 induced rat liver S9 mixtures was shown in (F). (H) was the DMSO solvent control. The other PAHs (Pyrene, FA, Anth, chrysene, B[g,h,i]P) of FOSC were not detected adducts in CL-3 cells. The major spots of the adducts were pointed with the arrow.



**Fig. 21.** The chromatograms of DNA adducts in CL-3 cells induced by (A)B[b]FA (10 $\mu$ g DNA was injected), (B)B[a]P (2 $\mu$ g DNA was injected) (C)FOSC-B (10 $\mu$ g DNA was injected) and (D)B[a]P and FOSC-B with 2 $\mu$ g and 8 $\mu$ g DNA injected respectively. These DNA adducts were purified from PEI plates. The radioactivity was monitored with  $\beta$ -RAM on-line radioactive detector.

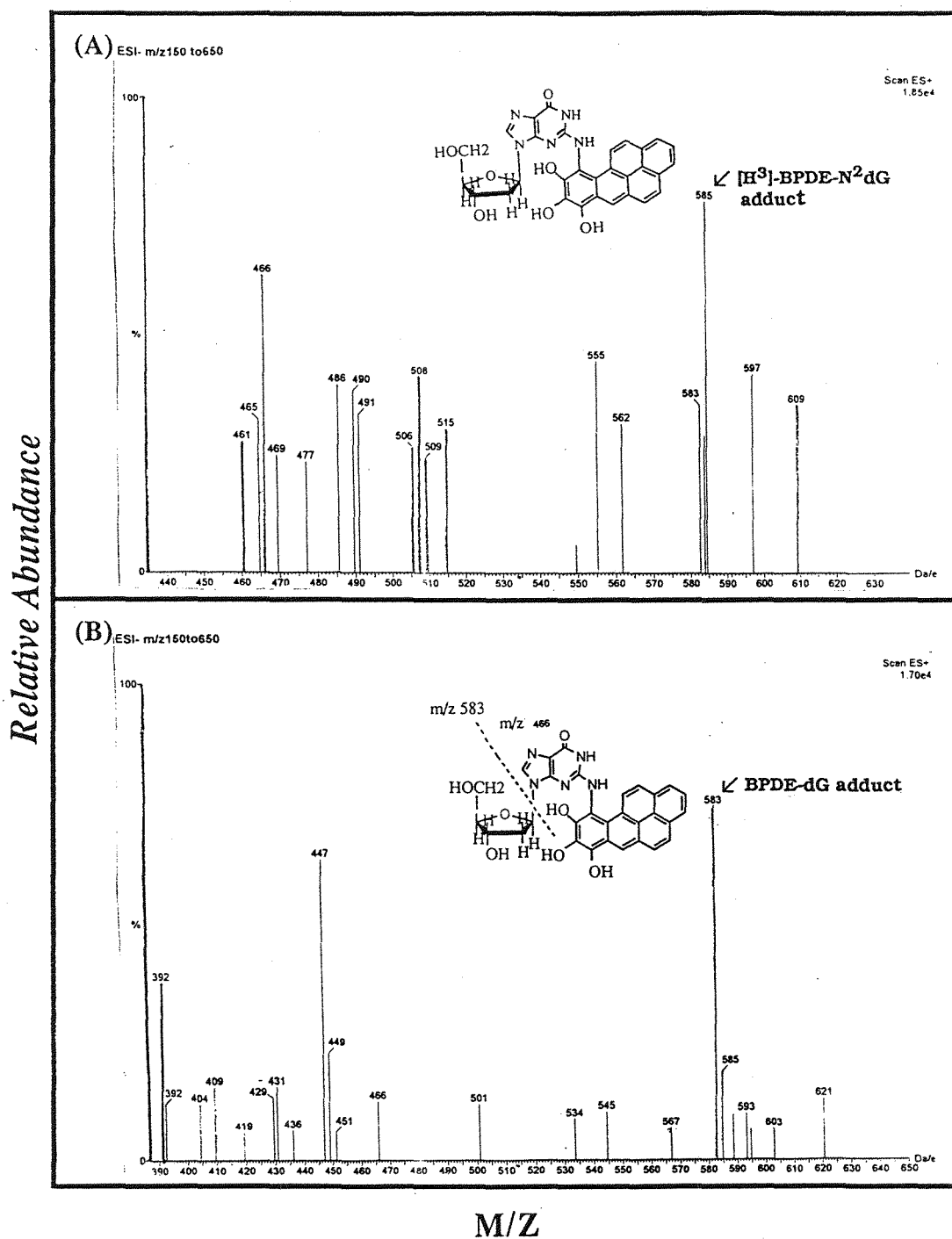
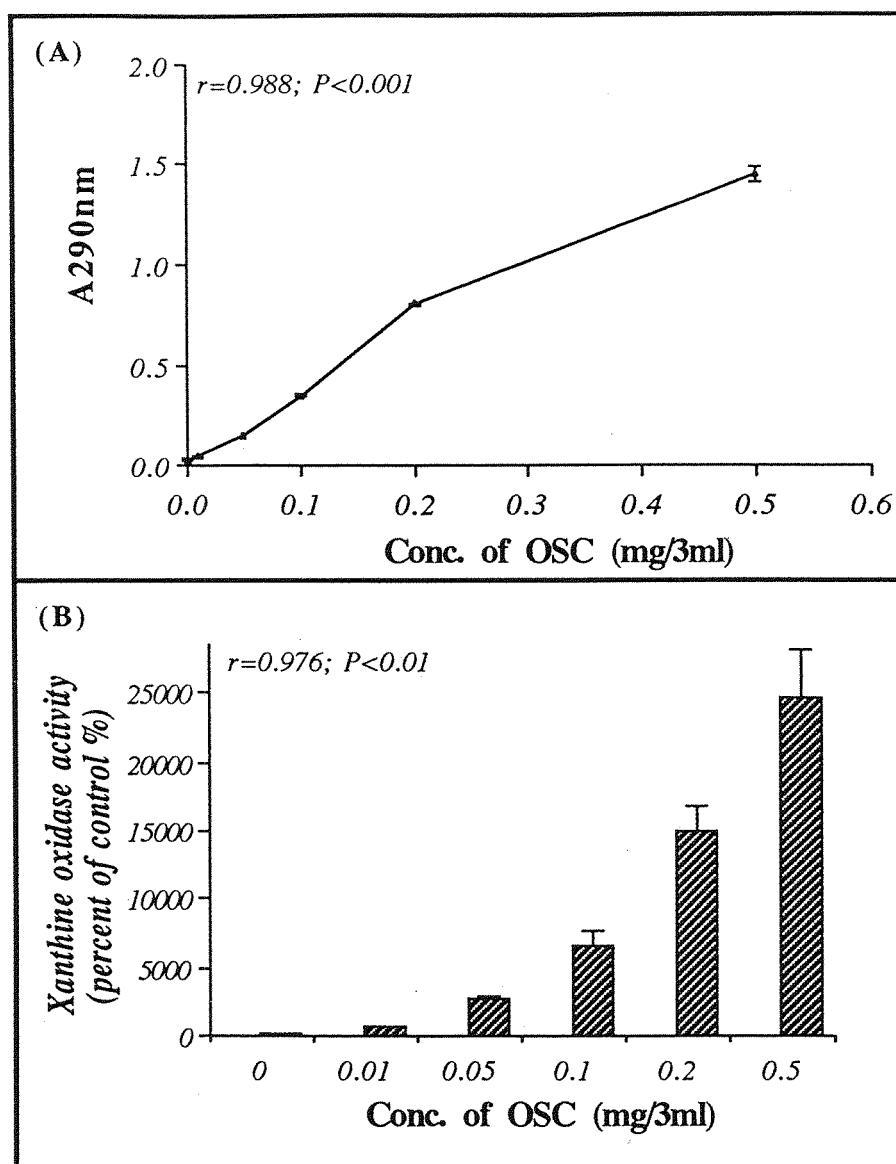
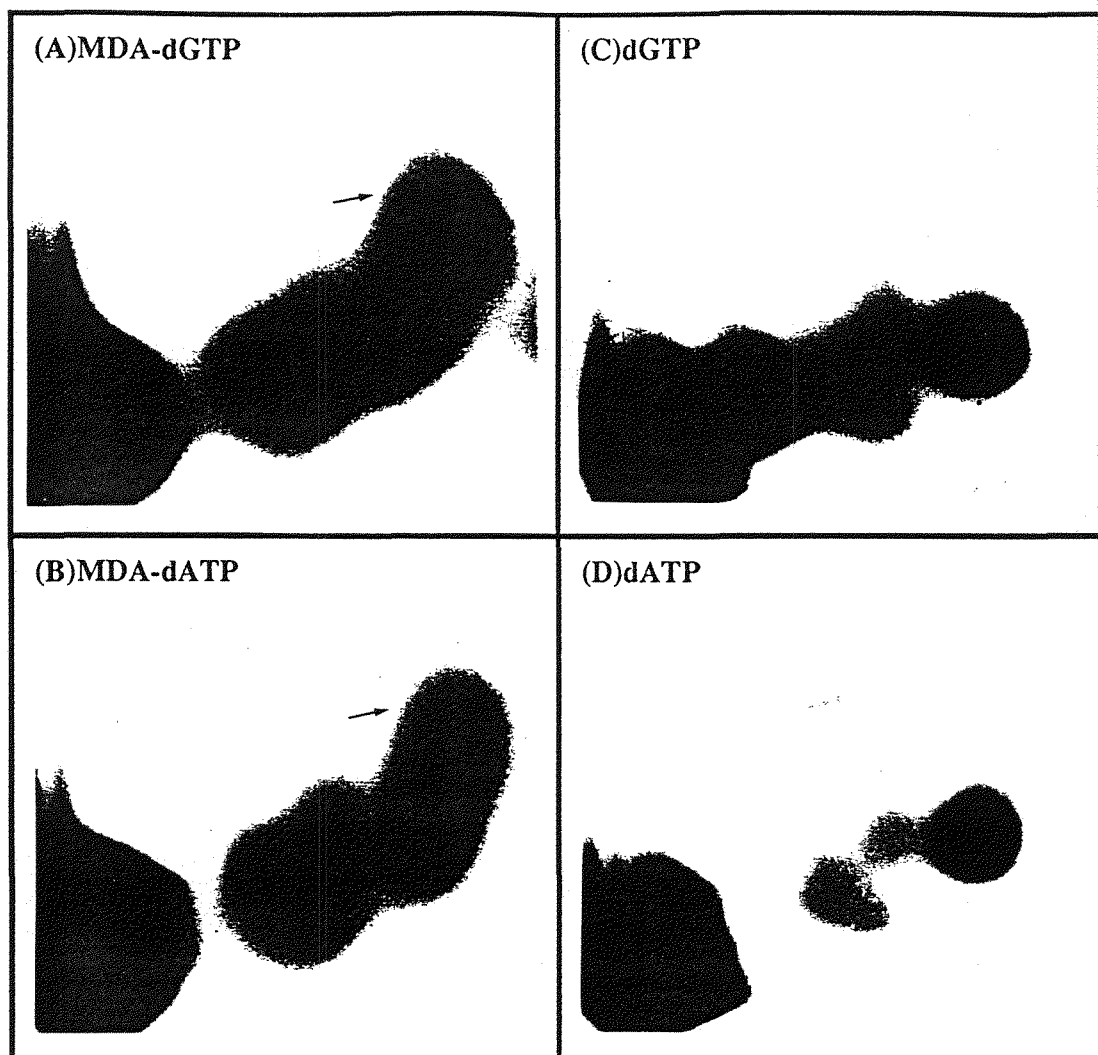


Fig. 22. The Electrospray Mass spectrum of (A)authentic standard [H<sup>3</sup>]-BPDE-N<sup>2</sup>-dG and (B)DNA adduct induced by FOSC in CL-3 cells.

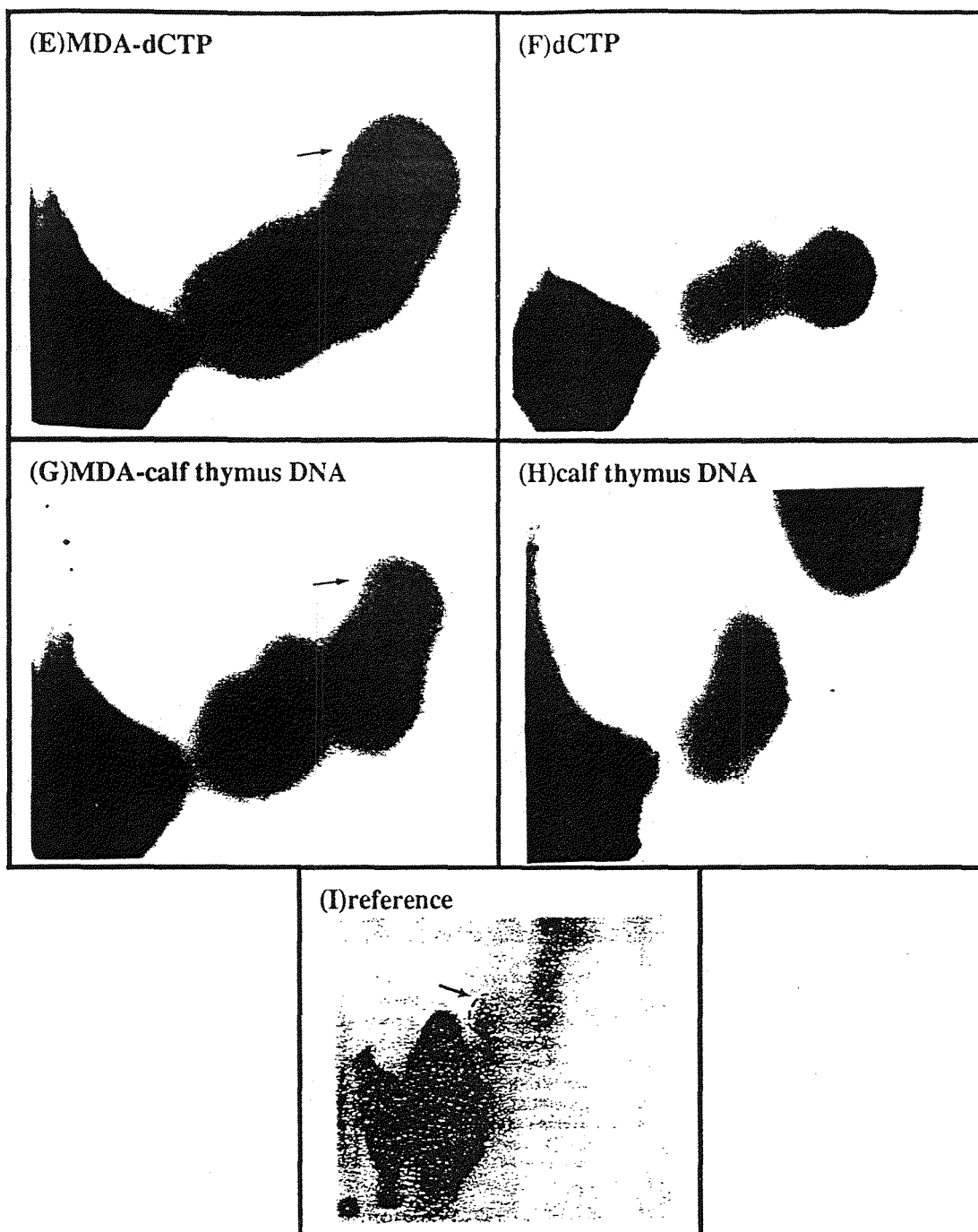


**Fig. 23.** The effects of FOSC on the activity of xanthine oxidase . Various concentrations of FOSC were added to reaction mixtures containing 0.08U/ml xanthine oxidase and 0.15 mM xanthine. (A)The amount of the urate, end product, was determined by the UV spectrophotometry at 290 nm. (B)The percent of control was calculated by formula : [ the A290nm values of samples ] / [ the A290nm values of solvent control (acetone) ]  $\times$  100%. All values were means  $\pm$  SD of three independent experiments.

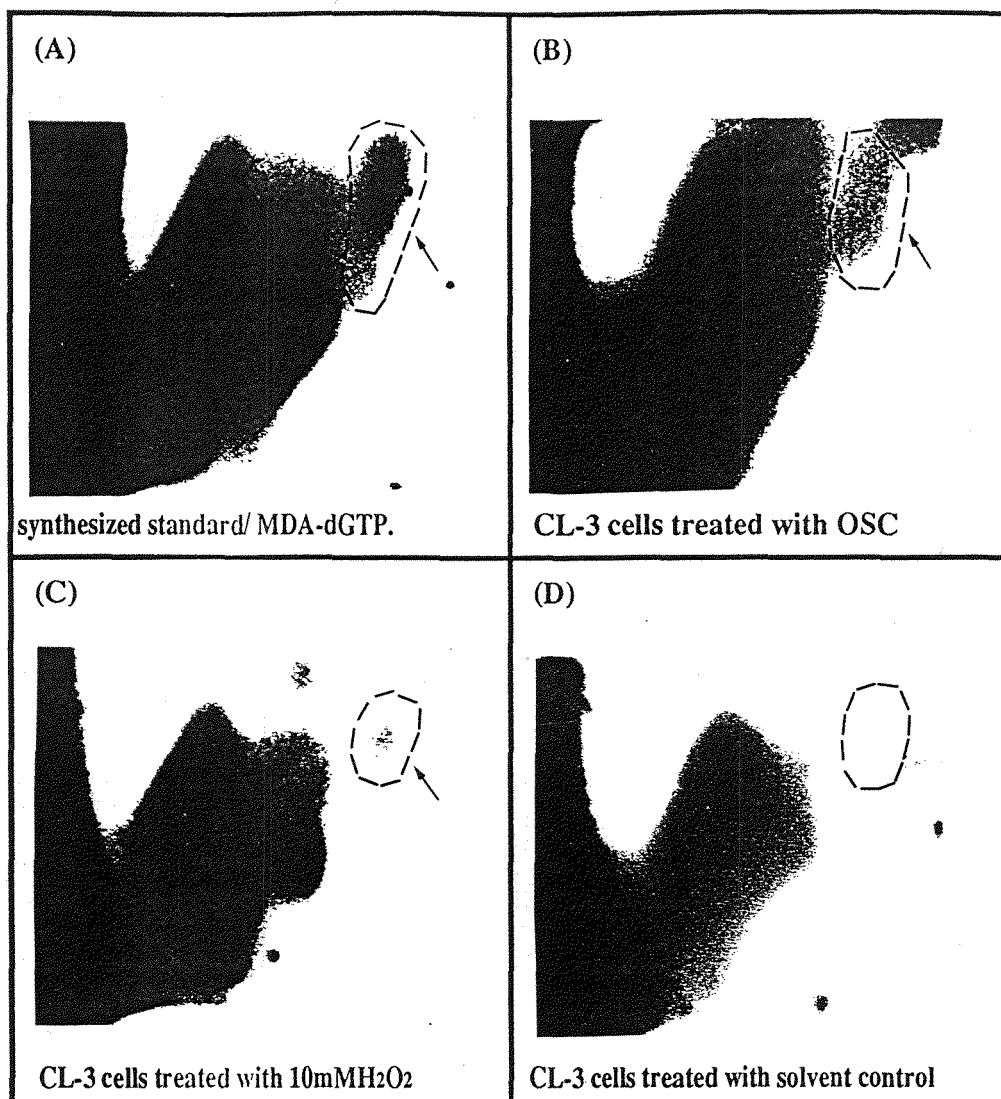


**Fig. 24-1.**  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of MDA-DNA adduct (indicated by arrows) formed in (A)dGTP and (B)dATP. The untreated (C)dGTP and (D)dATP were negative controls. Films were exposed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 12hrs.





**Fig.24-2.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of MDA-DNA adduct (indicated by arrows) formed in (E)dCTP and (G)calf thymus DNA. The untreated (F)dCTP and (H)calf thymus DNA were negative controls. (I) was the data taken from Vaca, C. E., et al., 1995, Carcinogenesis 16(8), 1847-1851 for comparison. Films were exposed at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 12hrs.**



**Fig. 25.** <sup>32</sup>P-postlabeling autoradiograms of authentic MDA-DNA adduct(indicated by arrows) from (A)the reaction of dGTP and TEP. (B) is and the DNA adducts from the CL-3 cells treated with 0.5mg of FOsc for 2 hrs , (C) is the DNA adducts from the CL-3 cells treated with 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.2 mM ascorbate for 1 hr , and solvent control (50μl acetone) . Films were exposed at -80°C for 8 hrs.

Relative Abundance

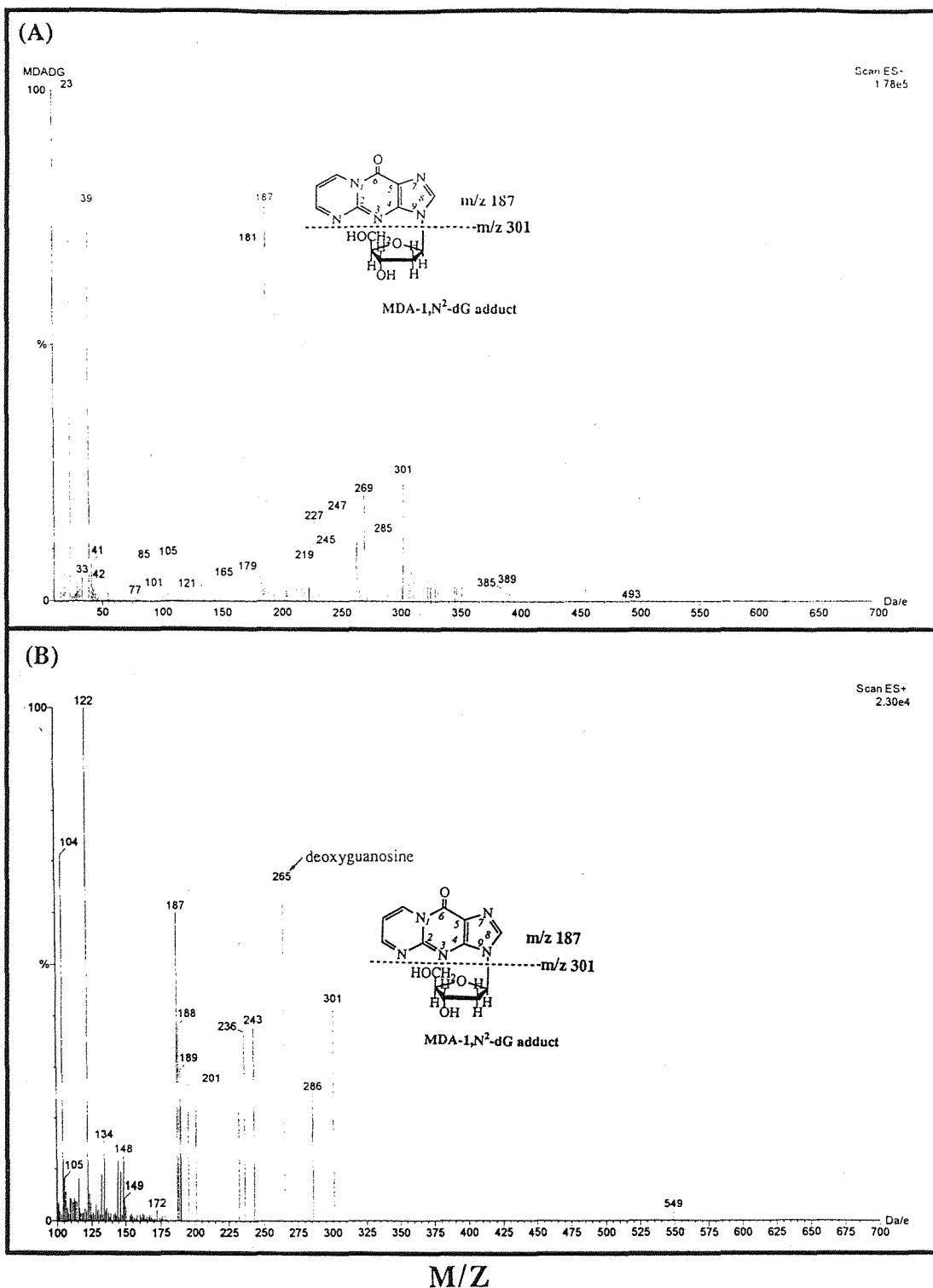
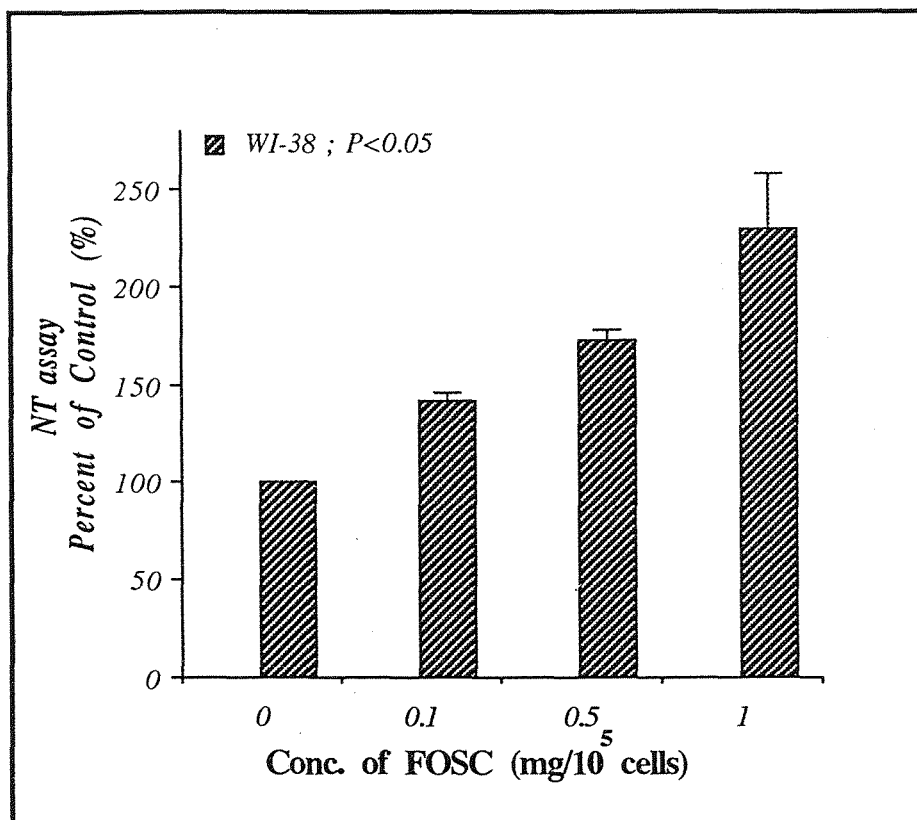
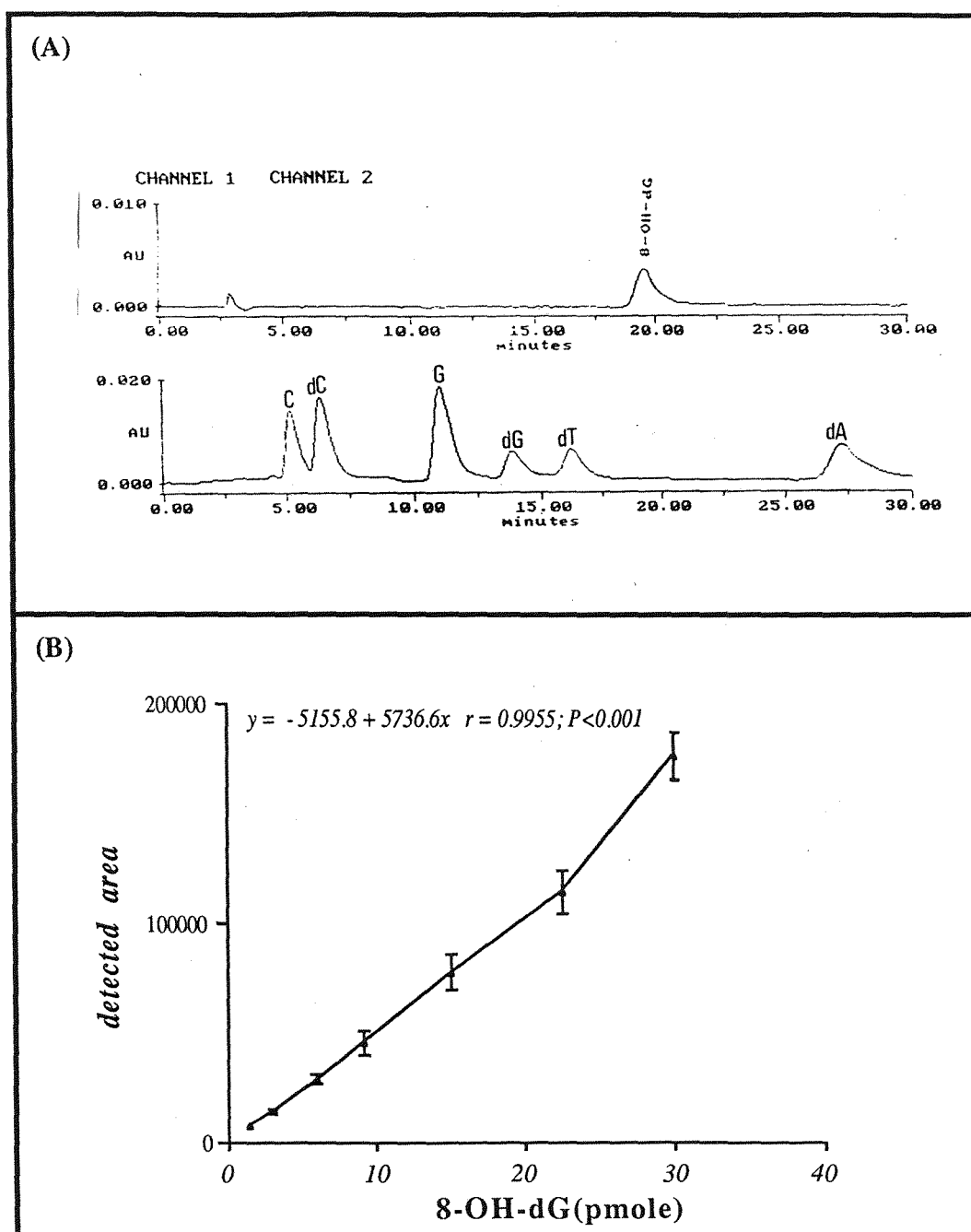


Fig. 26. The Electrospray mass spectrum of (A)authentic standard of MDA-1,N<sup>2</sup>-dG adduct. (B) is the DNA adduct from the CL-3 cells treated with FOXC for 24 hrs .



**Fig. 27.** The amounts of DNA single strand break in WI-38 lung cells ( $1 \times 10^5$ /dish) treated with various doses of FOSC for 2 hrs. The DNA single strand break was evaluated by nick translation assay.



**Fig. 28.** The chromatogram of 8-OH dG standard which was monitored with ECD detector and the other chromatogram of free nucleotides was monitored with UV detector(A). The dose-response curve of 8-OH-dG standard is shown in (B).

Relative Abundance

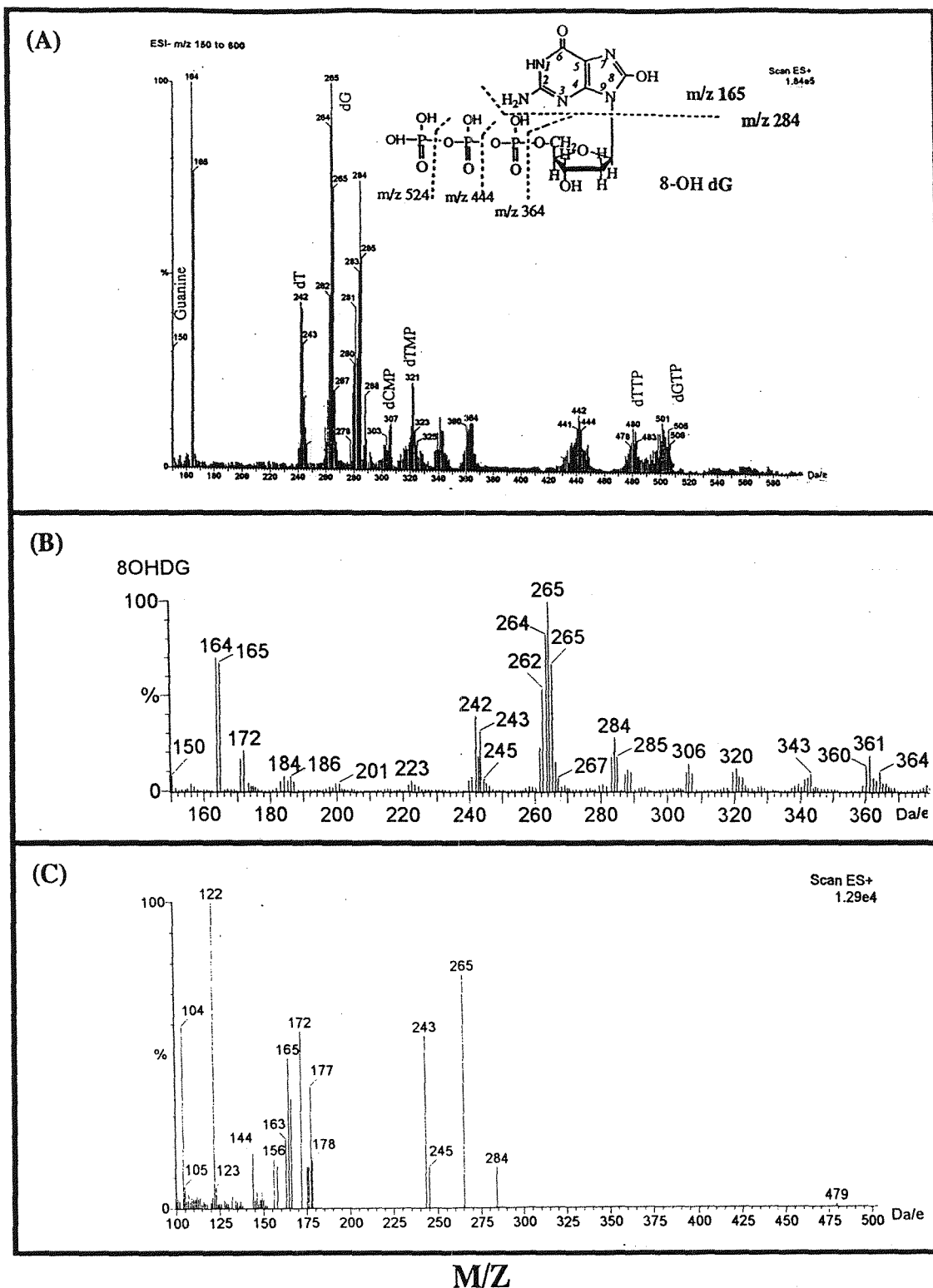
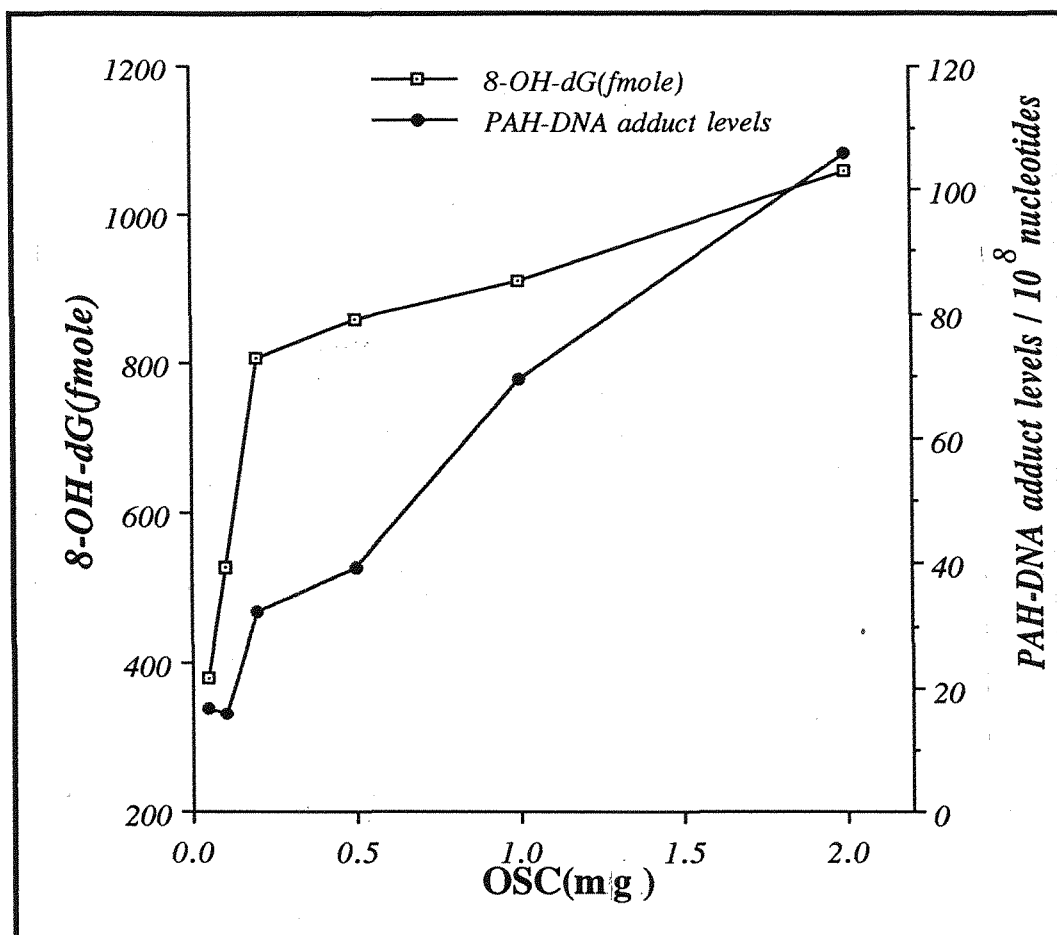
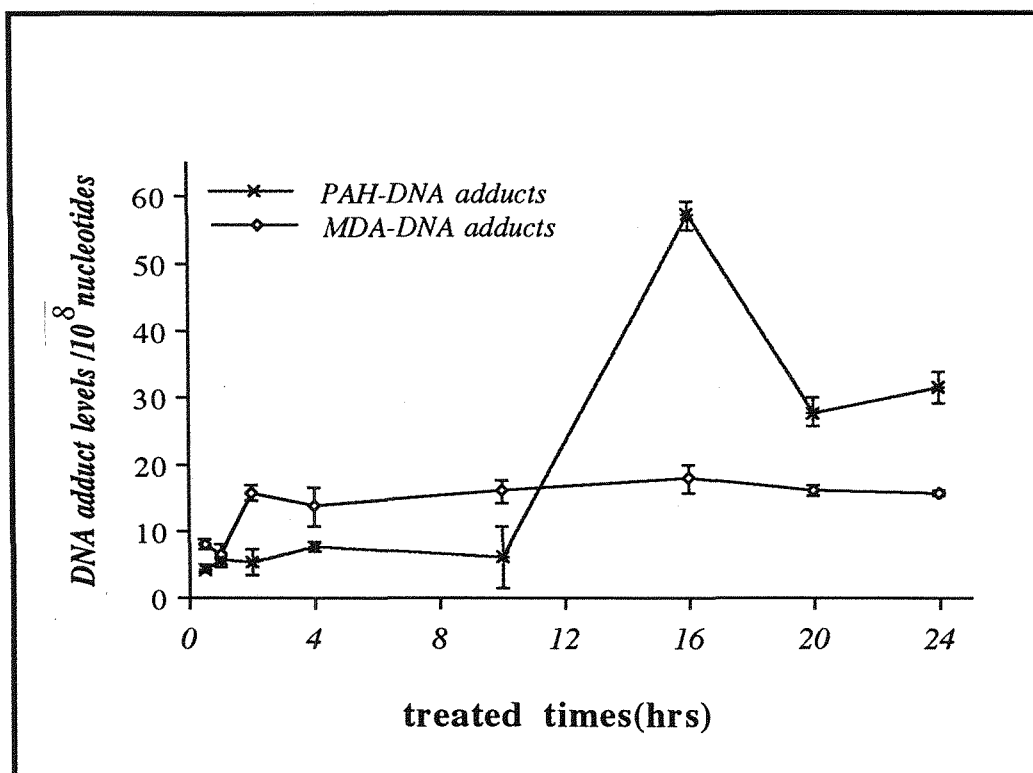


Fig. 29. The Electrospray mass spectrum of standard of 8-OH-dG(A). 8-OH dG formed in calf thymus DNA and CL-3 cells which were treated with FOSC for 2 hrs are shown in (B) and (C) , respectively.

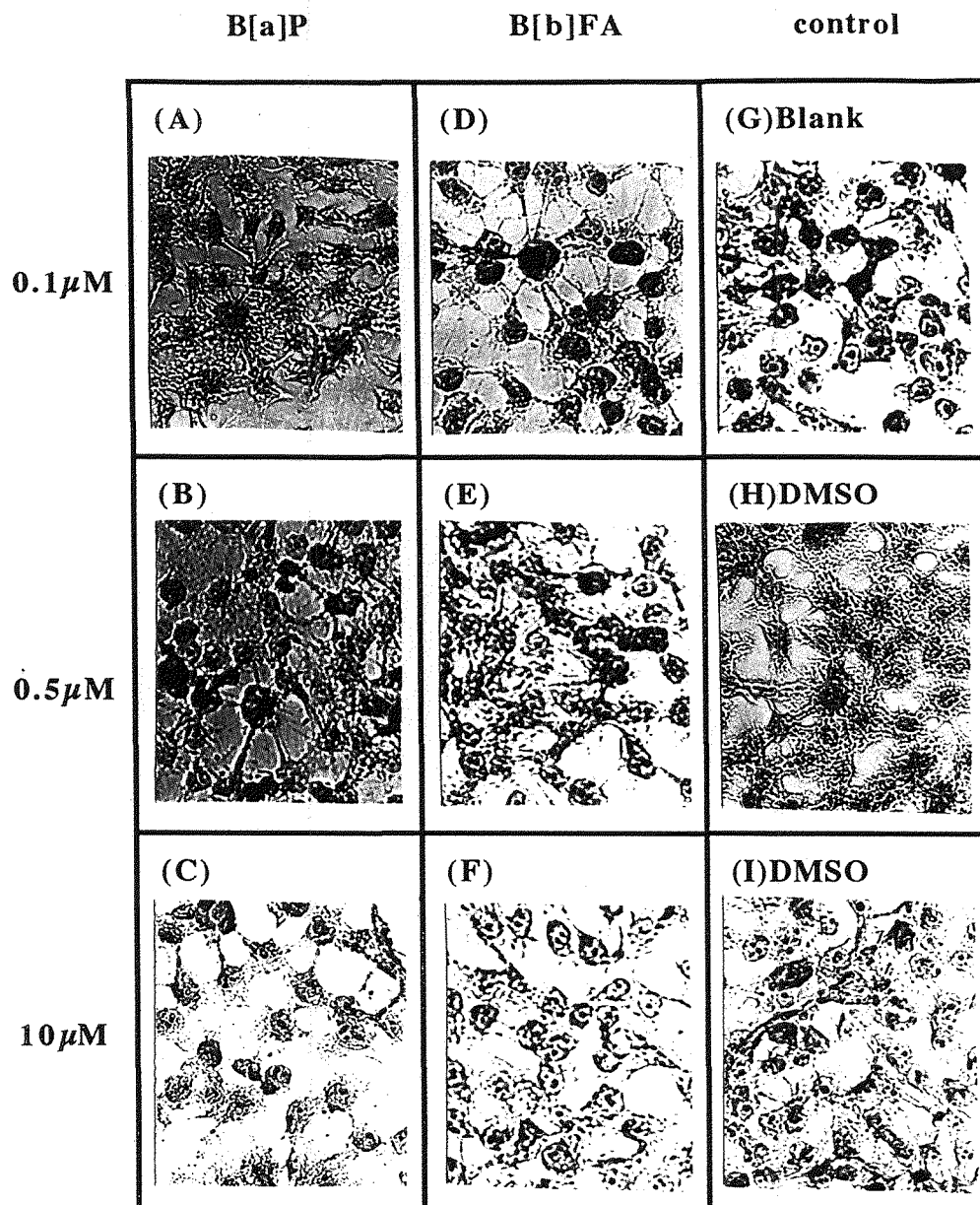


**Fig. 30.** The formation of 8-OH dG and PAHs-DNA adducts by FOsc in calf thymus DNA. 200  $\mu$ g Calf thymus DNA were treated by FOsc in the presence of 50  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  and S9 mix. for 2 hrs.

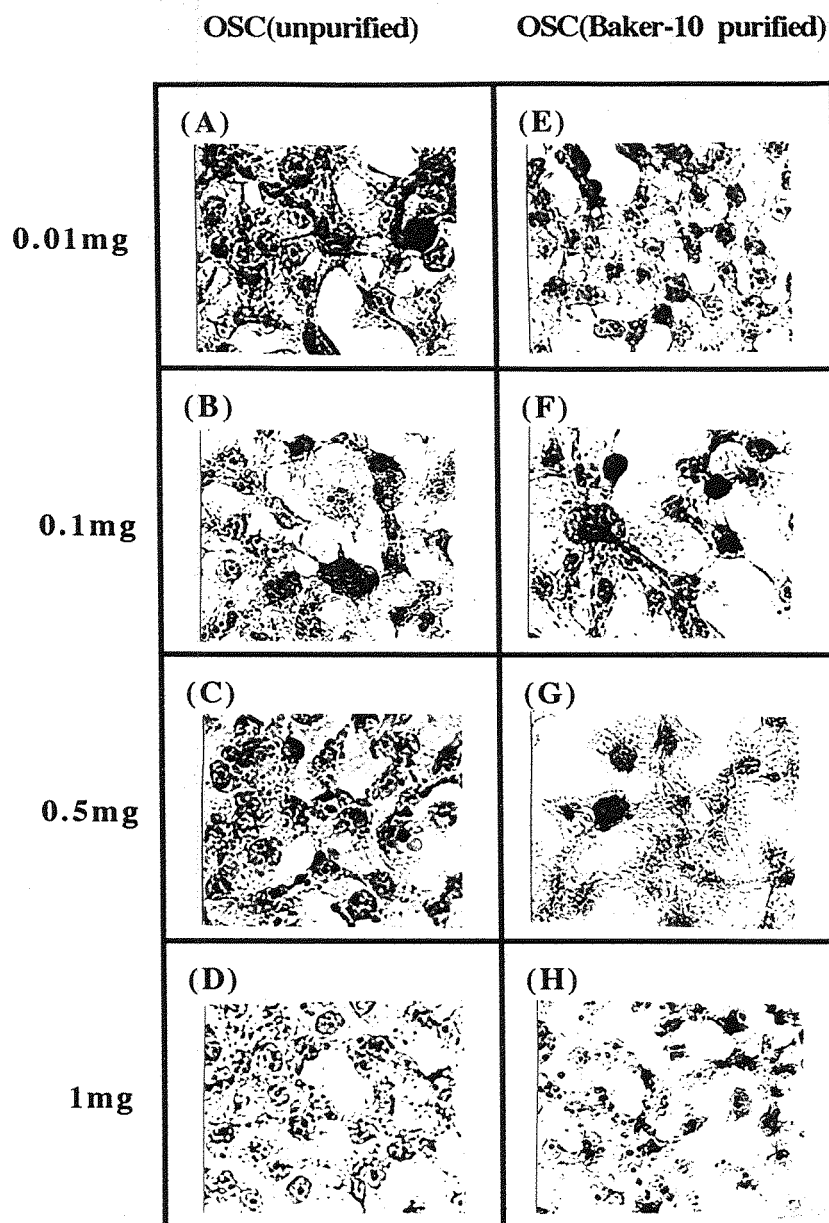


**Fig. 31.** The optimal treatment times of FOOSC in CL-3 cells for the formation of MDA- and PAH- DNA adducts. They were 2 hrs and 16 hrs for MDA- and PAH- DNA adduct formation, respectively. Values were means  $\pm$  SD of three independent experiments.

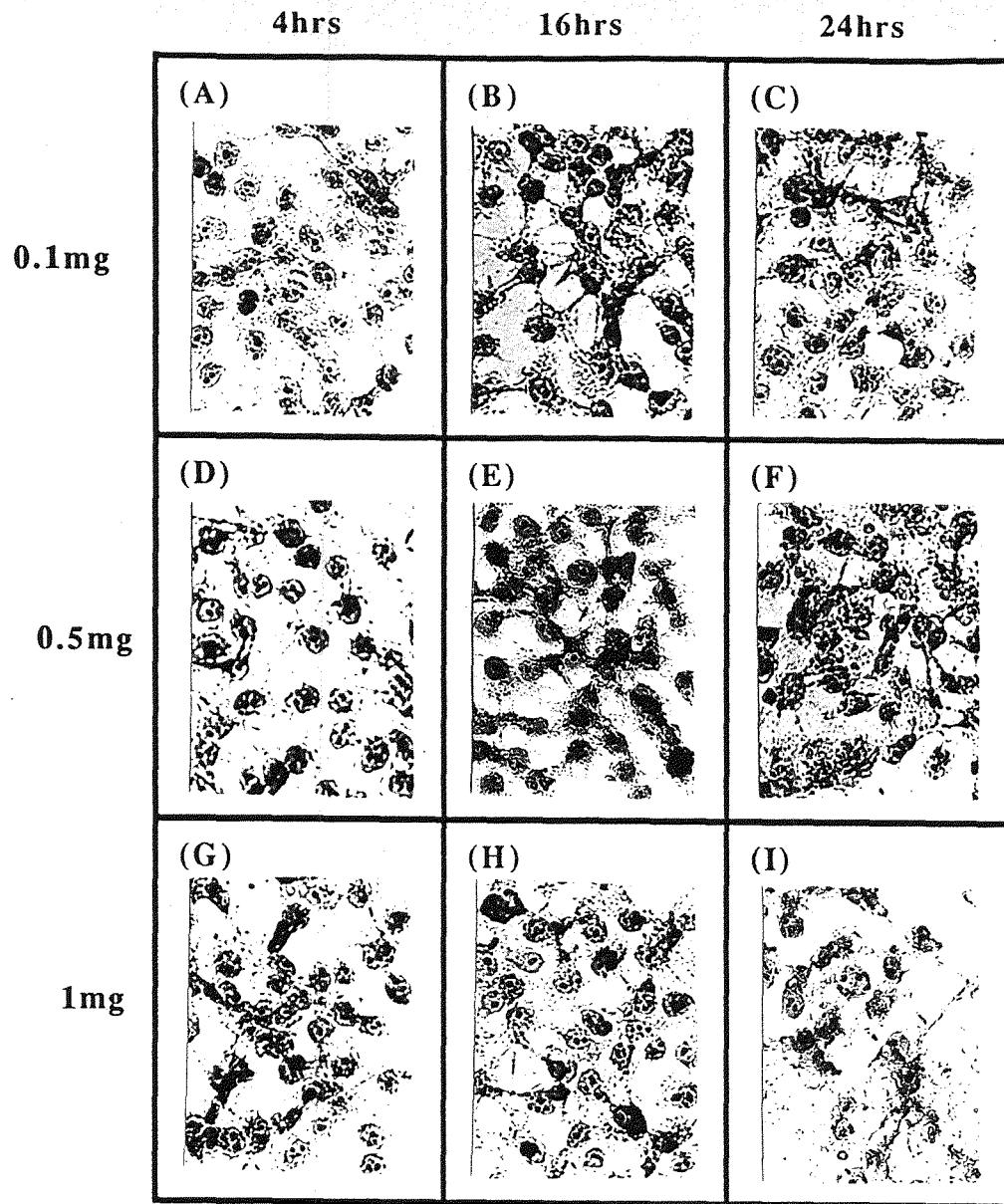




**Fig. 32.** The p53 protein expression in CL-3 cells treated with B[a]P : 0.1  $\mu$ M , 0.5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M (A~C) ; B[b]FA : 0.1  $\mu$ M , 0.5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M (D~F) for 24 hrs ; and controls : blank (G) , DMSO for 24 hrs (H) , and DMSO for 4 hrs (I).



**Fig. 33. The p53 protein expression in CL-3 cells treated with FOOSC : 0.01 mg , 0.1 mg , 0.5 mg and 1 mg (A~D) ; and FOOSC-B : 0.01 mg, 0.1 mg, 0.5 mg and 1 mg (E~H) for 24 hrs.**



**Fig. 34.** The p53 protein expression in CL-3 cells treated with 0.1 mg FOOSC : for 4 hrs , 16 hrs and 24 hrs (A~C) , 0.5 mg FOOSC : for 4 hrs , 16 hrs and 24 hrs (D~F) and 1 mg FOOSC : for 4 hrs , 16 hrs and 24 hrs (G~I).

Relative Abundance

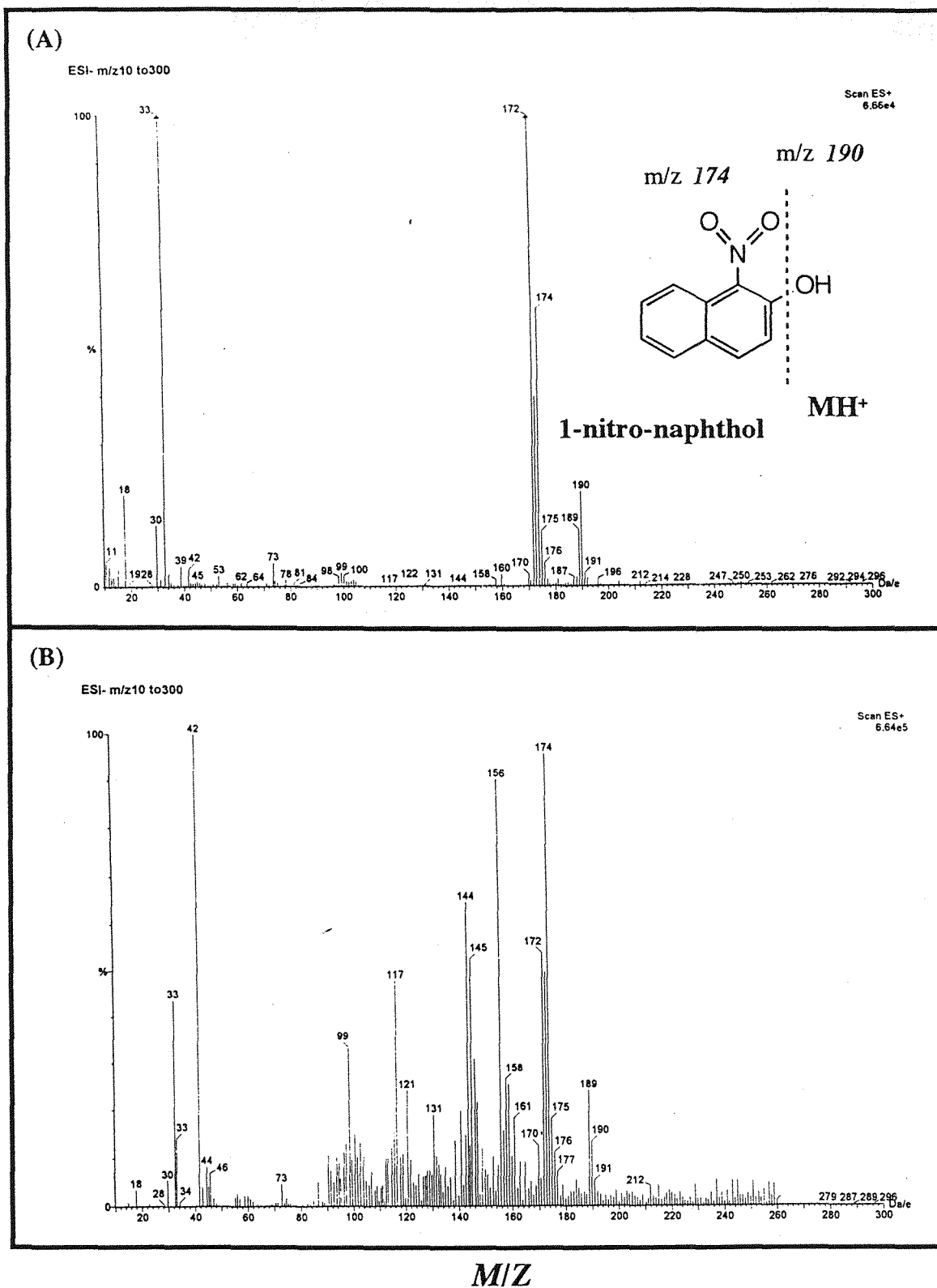
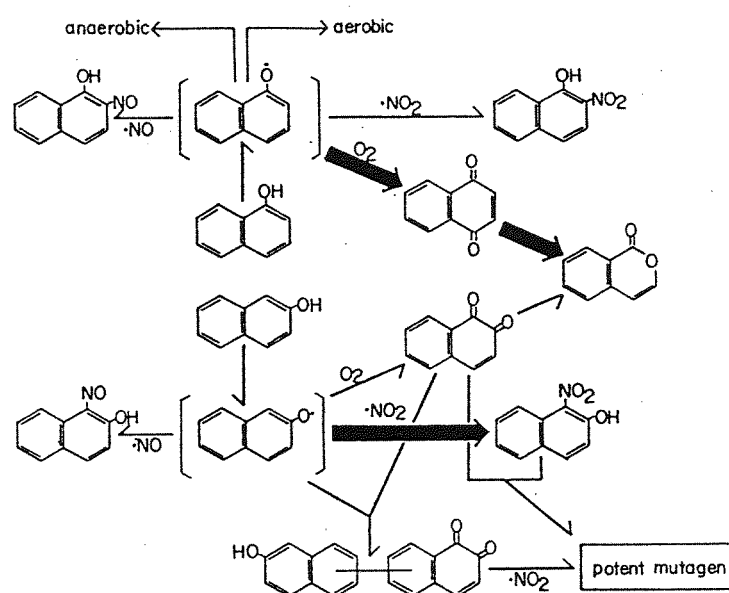


Fig. 35. The Electrospray mass spectrum of (A)authentic standard of 1-nitro-2-naphthol and (B)the active fraction of FOOSC from analytical RP-18 column.



**Fig. 36. Scheme of the main photochemical reaction of 1- and 2-Naphthols in aqueous nitrite solution under aerobic and anaerobic conditions and the route of formation of a potent mutagen from 2-naphthol.**

## 捌、英文摘要

Epidemiological data have been indicated that oil smokes from cooking were related with high incidence of lung cancer, especially in Chinese women. However, the major mutagenic/carcinogenic compounds in oil smoke particulates from cooking processing were still not characterized. To elucidate the correlation between oil smokes and the incidence of lung cancer in Chinese women, the major mutagenic compounds in oil smoke condensates from frying fishes (FOSC), DNA adducts formed in human lung adenocarcinoma CL-3 cells, and the oxidative damage induced by OSC were studied. The major direct mutagenic compounds in FOSC were characterized to be 1,6-dinitropyrene (1,6-DNP) and nitronaphthol by high performance liquid chromatography (HPLC), infrared spectrophotometry (IR), and electrospray mass spectrometry. The amounts of 1,6-DNP in kitchen during frying fish (4.7 ng/260 g fish) were 3 folds of urban airborne particulates in Taiwan. From the mutagenicity data indicated that the indirect mutagenicity of FOSC was greater than that of direct mutagenicity. Nine PAHs in FOSC showing indirect mutagenicity were determined by gas chromatography (GC) and HPLC. Benzo[*b*]fluoranthene was the most amount among the 9 PAHs. To elucidate the genotoxicity of FOSC in human lung cancer cells, the PAH-DNA adducts in CL-3 cells induced by FOSC were determined by <sup>32</sup>P-postlabeling assay. The DNA adducts formed a diagonal radioactive zone (DRZ) and a major spot of the DNA adducts was revealed in the DRZ. This major DNA adduct was then analyzed by HPLC coupling with on-line radioactive detector. The retention time was corresponding to the

authentic [<sup>3</sup>H] benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-N<sup>2</sup>-deoxyguanosine ( [<sup>3</sup>H]BPDE-N<sup>2</sup>-dG ) and the molecular weight of this adduct was consistent with the authentic [<sup>3</sup>H]BPDE-N<sup>2</sup>-dG by electron spray mass spectrometry compared with [<sup>3</sup>H]BPDE-N<sup>2</sup>-dG. Therefore, we concluded that the major genotoxic compound of FOSC induced in CL-3 cells is benzo[*a*]pyrene. Interestingly, the PAH-DNA adduct levels in CL-3 cells treated with FOSC were increased by the addition of 17β-estradiol.

To elucidate whether the oxidative damage was caused by FOSC, the formation of superoxide anion and lipid peroxidation in CL-3 cells were determined by the xanthine oxidase activity assay and thiobarbituric acid (TBA) assay respectively. Moreover, the maldealdehyde-DNA adducts (MDA-DNA adducts) were evaluated by <sup>32</sup>P-postlabeling and was identified by LC-MS. In addition, the 8-OH dG was also detected in both calf thymus DNA and CL-3 cells treated with FOSC. Surprisingly, ascorbate, a free radical scavenger greatly reduced the amounts of PAH-DNA adducts induced by FOSC in CL-3 cells. Furthermore, the expression of p53 protein in CL-3 cells was decreased by the increasing dosage and treatment times of FOSC. In summary, oil smoke from frying fish caused DNA damages including DNA-adduct and modified DNA base as well as MDA-DNA adduct induced by PAHs and free radicals respectively. Our research will gain more insight on the correlation between the formation of lung cancer in Taiwanese women and oil smoke from cooking.

## 玖、個人資料

姓名：楊森智 (Sen-Chih Yang)

生日：中華民國 60 年 4 月 9 日

性別：男

籍貫：台灣省澎湖縣

永久聯絡地址：台南市北區和緯路四段 117 巷 43 號

電話：06-2584345

### 一、學歷：

私立中山醫學院生物化學研究所 理學碩士 1995,7. ~ 1997,7.

國立中興大學植物病理學系 理學士 1991,8. ~ 1995,6.

### 二、實驗技術：

DNA 鍵結物分析      HPLC 分析      細胞免疫染色  
細胞培養              基因毒性測定      氧化性傷害測定  
PCR、DNA 定序      專一蛋白純化與分析( SDS PAGE, 2-D 蛋  
白電泳, western blotting, 抗體製備, protein mapping, et al.)

### 三、自 傳

一九七一年四月九日，在台南市的楊中和警官家中，小公兒誕生了。在這之前，大女兒雯卿三歲、長子森喬二歲，早已是家中的小霸王。如今，又添個小兒子森智的加入，使得三小霸王威名不但稱霸家中，且響透街巷鄰里，可謂威力凡人無法擋！不



但累壞了奶奶和父母，最慘的是家中的博美犬哈利已及魚缸中的小魚們。雖如此，三小霸王仍然是家中最寶貝的三小寶貝蛋。

由於從小就在基督教家庭中長大，不但在家中有親人疼愛，在教會中更有許多的長輩和大哥哥、大姐姐疼，讓我從小就在神的大愛中成長，實在是太幸福了！就讀台南市立人國小、民德國中期間，共當了六年班長、二年風紀、一年學藝股長，接著繼續就讀台南二中，已及中興大學植物病理學系。最後選擇中山醫學院生化所 李 輝 教授實驗室繼續攻讀碩士。在中學時代，影響我最深的人，家人除外就數莊哥（莊孝盛牧師）和陳姐（陳信惠牧師）了，夫妻兩人皆在彰化竹塘牧會、他們永遠是我深愛的人。不但幫助我中學信仰的成長，在生活各方面更是如此。使中學時代的我，不但更確定自己的信仰，對未來要走的路有了更清楚的標竿。

好奇寶寶的我，從小就對許多事物充滿了好奇，因此造就了興趣廣泛與多才多藝的我；舉凡美術、音樂、運動、研讀、自然等各方面皆是我所愛。直到遇見了神才找到我的最愛。高中時立下的心志：「傾全愛，永不渝，燃一生之壇，獻永恆之祭。」時時敲擊我的心。因此考進大學的第一天，就抱定每一天都要過得最有意義。感謝神！四年的大學以及兩年的碩士生活不但無怨無悔且豐盛無比、恩上加恩，超乎我所求所想的。不但使我更具有世界觀，也更加清楚看見一生所要奔跑的道路。

大學時期，曾在中興大學遺傳工程中心王國祥老師研究室，待了兩年以實驗室為家的日子，著實地讓我體會到科學研究的重要，更須不斷接受嚴謹的專才訓練和吸收新的資訊，再加上每當探索生命的奧秘時，倍覺造物主的奇妙偉大。而神愛我愈深，愈不斷地加深我對每一生命的景仰與關愛，希望看到自己所做的

真的直接有益於人類，即使是對人有一絲毫的助益都會催促著我  
去做抱著畢生能夠『榮神益人』的心志，因此才決定報考醫學院  
生化所。偉大科學家牛頓，當人們讚歎其一生偉大的成就時，他  
回答：只不過順服上帝的心意。因此常在思索上帝的心意。

為天地立心，為生民立命，為往聖繼絕學，為萬世開太平  
。為吾一生之職志！