

R  
008.8  
4419  
87

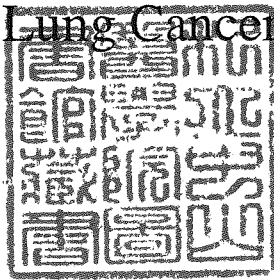
# 中山醫學院毒理學研究所碩士論文

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

指導教授：李 輝 博士 (H. Lee, Ph. D.)

黃體酮受體和 CYP1A1 表現對女性肺癌患者  
化學感受性之影響

The Association between Progesterone Receptor and  
CYP1A1, and Chemical Susceptibility of  
Female Lung Cancer Patient



研究生：黃 玉 怡 (Yu-Yi Huang) 撰  
中華民國八十七年七月

中山醫學院圖書館



C050056

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 毒理學研究所  
\_\_\_\_\_ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：黃體酮受體和 CYP1A1 表現對女性肺癌患者化學感受性之影響

同意 不同意

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

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 \_\_ 年 \_\_ 月後再公開。

同意 不同意

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

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：李 輝

研究生簽名：黃 玉 怡 學號：R85503  
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 7 月 22 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：黃玉怡 聯絡電話：(03) 3370315

地址：桃園市信芝路22號

黃體酮受體和 CYP1A1 表現對女性肺癌患者  
化學感受性之影響

The Association between Progesterone Receptor and  
CYP1A1, and Chemical Susceptibility of  
Female Lung Cancer Patient

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

口試委員

國立台灣大學醫學院毒理學研究所教授

翁祖輝 博士

翁祖輝

國立中國醫藥研究所副研究員

翁芸芳 博士

翁芸芳

私立中山醫學院毒理學研究所教授

李輝 博士

(本論文指導教授)

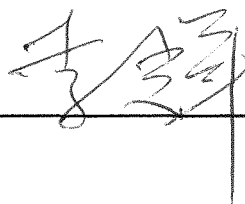
李輝

中華民國八十七年七月

學生黃玉怡論文題目為黃體酮受體和 CYP1A1 表現對女性肺癌患者化學感受性之影響，其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李輝 博士

簽名：

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

中華民國八十七年 月 日

# 目 錄

壹、中文摘要	1
貳、文獻綜論	4
一、肺癌的流行病學研究	4
二、女性肺癌和環境污染物	4
(一) 二手煙	6
(二) 拜香	7
(三) 蚊香	7
(四) 廚房油煙	8
三、PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)	10
四、化學感受性	13
五、女性荷爾蒙	13
參、研究動機	16
肆、材料與方法	
一、化學藥品與材料	18

二、肺組織之實驗測定	19
2.1 肺癌病患之肺組織檢體來源	19
2.2 肺組織切片之免疫組織染色方法	19
2.3 肺組織微粒體懸浮液之製備	20
2.4 蛋白含量之測定	21
2.5 肺組織 CYP1A1 蛋白表現量之分析	
— 西方墨點法 (Western blot)	21
2.6 肺組織 RNA 之製備	22
2.7 肺組織 CYP1A1 mRNA 表現量之分析— RT-PCR	23
三、肺癌細胞株之實驗測定	
3.1 台灣肺癌細胞株 CL-3 細胞之來源	24
3.2 細胞培養	24
3.3 萃取 DNA	24
3.4 B[a]P-DNA 鍵結物之分析	25
3.5 B[a]P 代謝物之萃取	26
3.6 B[a]P 代謝物之分析— HPLC 分析	27
3.7 CL-3 細胞微粒體懸浮液之製備	28
3.8 CYP1A1 之酵素活性測定	
-EROD (7-Ethoxyresorufin O-deethylase)	28

伍、結果與討論	
一、台灣地區肺癌組織切片中雌性素受體及黃體酮受體 在免疫組織染色的表現	30
二、台灣地區肺癌組織中非腫瘤部份之 CYP1A1 基因的表現 — CYP1A1 蛋白的表現 (Western blot) 及 mRNA 的表現	32
三、雌性素與黃體酮對台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞 形成 B[a]P-DNA 鍵結物的影響	34
四、雌性素對台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞中 B[a]P 代謝物分佈的影響	36
五、雌性素在 CL-3 肺腺癌細胞中對 B[a]P 所引起之 CYP1A1 酵素活性表現之影響	38
陸、參考文獻	40
柒、圖表	60
捌、英文摘要	80



## ABBREVIATIONS

$\alpha$ -naphthoflavone	$\alpha$ -NF
Benzo[a]pyrene	B[a]P
anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene	BPDE
N-(deoxyguanosine-8-N <sup>2</sup> -yl)-anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene	BPDE-N <sup>2</sup> -dG
$\beta$ -naphthoflavone	$\beta$ -NF
Cytochrome P450 1A1	CYP1A1
1,6-Dinitropyrene	1,6-DNP
Estrogen receptor	ER
Fetal bovin serum	FBS
Oil smoke condensates from frying fish	FOSC
Glutathione S-transferase	GST
High performance liquid chromatography	HPLC
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	LC-MS
Nuclease P1	NP1
Micrococcal endonuclease	MN
Murine double minute	MDM2

Polycyclic aromatic hydrocarbon	PAH
Phosphate buffered saline	PBS
Progesterone receptor	PR
Thin-layer chromatography	TLC
Sister chromatid exchange	SCE
Spleen phosphodiesterase	SPD

## 壹、中文摘要

肺癌已成為台灣地區十大死因之首，而其中男性肺癌死亡率上升趨勢自 1980 年代開始漸緩，但女性肺癌死亡率卻仍持續上升。已知導致肺癌發生最重要的危險因子是吸煙，雖然在台灣地區的女性吸煙人口僅佔百分之三，但女性肺癌的死亡率卻仍高居不下。而由過去本研究室分析台灣地區肺癌組織中之 DNA 鍵結物的含量，結果發現不吸煙之女性肺癌肺組織中，其 DNA 鍵結物的含量較男性為高。因此我們欲探討為何不吸煙之女性肺癌肺組織中仍有較高的 DNA 鍵結物含量，是否因女性曝露較多之特殊環境污染物，例如油煙、拜香等。也可能因女性荷爾蒙控制和男性不同而導致對環境污染物之感受性高。

由於先前實驗證實女性特殊環境污染物-烹調油煙中以 PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon) 是主要引起基因毒性的化合物。因此我們欲探討女性體內主要的荷爾蒙—雌性素、黃體酮，對女性肺癌 DNA 鍵結物形成之影響。我們首先以免疫組織染色法，偵測 27 位肺癌病患肺組織切片中雌性素受體與黃體酮受體的表現量，結果發現女性肺癌的黃體酮受體表現量顯著的較男性為高 ( $47\% > 17\%$ ,  $P < 0.05$ )，同時發現黃體酮受體表現量高的肺癌患者之 DNA 鍵結物的含量有較高的趨勢，但在統計上卻沒有意義 ( $P > 0.05$ )。因此推測黃體酮受體的表現似乎可能與女性肺癌組織之 DNA 鍵結物含量較男性患者為高有關。

由過去研究得知 PAH 主要經 cytochrome P4501A1 的代謝活化而形

成具有攻擊 DNA 能力之代謝產物。因此我們以西方墨點法和反轉錄—多連鎖聚合反應法 (RT-PCR) 分析五位男性和十位女性肺癌患者之非腫瘤組織中 CYP1A1 基因的表現，結果得知女性肺癌組織之 CYP1A1 蛋白的表現高於男性有兩倍多，其差異具有統計上的意義 ( $P < 0.05$ )。而女性肺癌患者之 CYP1A1 mRNA 也較男性患者強百分之六十九的表現，但並沒有統計上的意義 ( $P > 0.05$ )。因此女性患者肺組織中 CYP1A1 基因的蛋白表現較男性為強。由女性肺癌患者之肺組織中黃體酮受體和 CYP1A1 的蛋白表現量均較男性為高的結果推測，女性肺癌患者對 PAH 環境污染物之感受性較男性為高，可能和女性體內黃體素酮和肺組織中的黃體酮受體較高，而使得女性肺癌患者之 CYP1A1 的表現較男性為強。此項推論，仍須更多的實驗來證明。

爲了了解雌性素與黃體酮對 PAH 環境污染物在肺組織是否具有誘發 CYP1A1 基因的表現改變而造成其攻擊 DNA 的能力增高？因此我們進一步在臺灣肺腺癌 CL-3 細胞株中同時加入 B[a]P 和雌性素或黃體酮，以  $^{32}\text{P}$ -postlabeling 分析法分析 B[a]P-DNA 鍵結物的含量有何變化？結果發現兩者皆會促進 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物的形成，而高濃度的雌性素 (0.25ng/ml) 及黃體酮 (20ng/ml) 分別可增高 CL-3 細胞的 B[a]P-DNA 鍵結物的含量達 2.73 及 2.93 倍。爲了解雌性素對 B[a]P 代謝的影響，我們以高效液態層析儀並配有放射性偵測器追蹤分析經 CL-3 細胞代謝後之  $^3\text{H}$ B[a]P 放射性代謝產物的分佈，偵測到主要代表 CYP1A1 之 AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase) 酵素活性的 B[a]P 代謝產物—3-OH B[a]P 的含量，在雌性素存在下，其產量增加了百分之三十。同時發現 7,8-diol 和 9,10-diol B[a]P 的代謝產物也有增加的現象。這顯示雌性素可能會增強

CL-3 細胞之 CYP1A1 的代謝 B[a]P 的能力。另外我們也分析雌性素對 B[a]P 造成 CL-3 細胞之 EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase) 酵素活性的影響，也發現雌性素能促進 EROD 的酵素活性。由以上在 CL-3 細胞的研究結果能進一步印證在肺組織上的結果，並推測雌性素與黃體酮可能透過調控 CYP1A1 之酵素活性而影響 PAH 環境污染物的代謝，進而促進其 PAH-DNA 鍵結物的形成。

綜合以上的結果，我們可由女性肺癌組織中 CYP1A1 基因的表現來解釋為何女性肺癌組織 DNA 鍵結物含量較男性高。同時雌性素與黃體酮的參與也可能造成女性對環境污染物之感受性較男性為高的原因。

## 貳、文獻綜論

### 一、肺癌的流行病學研究

根據衛生署統計資料顯示，自民國七十一年以來，癌症一直是國內第一大死亡原因(衛生署，生命統計，1984-1996)，而肺癌佔其中之16%至21%癌症死亡人數。1955年台灣地區男性與女性中，每十萬人口中分別有2.67人和1.25人是因罹患肺癌而導致死亡的，而1996年男性與女性肺癌死亡率已分別達每十萬人有34.87人及15.30人(衛生署，生命統計，1955-1996)。十年之間肺癌死亡率已經增加了十二至十三倍，是惡性腫瘤所造成之死亡數中增加速度最為顯著的一種癌症，更令人注意的是至民國八十六年底，肺癌之死亡率已高過肝癌而躍居為臺灣地區十大死因之首(衛生署，生命統計，1997)。因此研究台灣地區肺癌發生之可能原因及影響因子是重要之研究課題。

### 二、女性肺癌和環境污染物

由流行病學的研究結果發現男性肺癌死亡率的上升趨勢至1980年代初期即開始漸緩，但女性肺癌死亡率卻仍繼續大幅上升(CDC, 1993)，自

1950年至1994年止，女性肺癌的死亡率已增加了五倍，而同期男性僅增加二倍 (American Cancer Society, 1994)，至1987年肺癌死亡率已高過乳癌而成爲美國女性癌症死亡原因之第一位 (Ernster, 1994)。已知導致肺癌發生最重要的危險因子乃是吸煙( Schneiderman et al., 1989; IARC, 1986; Zaridze et al., 1986; CDC, 1991)，在臺灣地區，女性肺癌患者絕大多數都沒有吸煙 (僅 3.27% 吸煙)，可是肺癌死亡率竟達到每十萬人有十六人，而男性吸煙人口高達 54.75%，但其肺癌死亡率僅較女性高一倍餘 (Department of Health, R.O.C.,1996)。我們由過去研究發現中國女性罹患肺腺癌的比率較其他型的肺癌爲高 (Deng and Gao, 1985)，且由本實驗室所分析之台灣女性肺癌病患中亦以罹患肺腺癌居多。由於吸菸主要與鱗狀上皮細胞癌及小細胞癌的發生有關而與腺癌的發生關係較低 (Lubin, 1984; Gao et al., 1987; Higgins, 1988; Watkin, 1989; Brownson, 1992)。另外本實驗室分析台灣地區吸煙與不吸煙肺癌病患之間，DNA 鍵結物的含量沒有差異，而且吸煙數量和 DNA 鍵結物的含量也無相關性 (Chen Master Thesis, 1996)。這些研究結果似乎顯示吸煙與女性肺癌的高發生率較無相關，可能還有其他環境因子與女性肺癌的發生有關。在引起肺癌之污染源的研究上，除了二手煙外，仍有其他可能導致肺癌發生的環境致癌物質，例如：石綿、砷、鉻、鎳和多環芳香烴類及農藥等皆會因受到長期的暴露，而增加肺癌的發生率 (Frank et al., 1987; Alavanja et al., 1993; Brownson et al., 1993)。另外常見的空氣污染源如：汽機車排放物，以及在室內污染源的研究上，點燃拜香及蚊香所產生的煙霧 (Lee et al., 1988; Lofroth et al., 1991; Li et al., 1993)，與家庭中烹調所產生的油煙可能都與肺癌的發生有些關係

(Berg et al., 1988; Teschke et al., 1989)。但這些研究都僅止於流行病學的研究，尚缺毒理學上的有力證據。為探討台灣地區女性肺癌死亡率上升的趨勢較男性高之原因，除了上述因中國女性所暴露之室內特殊的污染源，另一方面可能是女性對環境污染物之感受性與男性不同，以及女性體內所分泌之雌性素與黃體酮可能調控細胞接受環境污染物刺激的機制而促使女性肺癌的發生。因此以下先就中國女性可能曝露之特殊環境污染物與其肺癌發生的相關性作一探討，並分述如下：

### (一) 二手菸

女性所曝露之二手煙對女性肺癌發生之影響。Hirayama 等 (1981) 研究指出，不吸煙婦女的丈夫若有吸煙習慣時，發生肺癌的危險率較丈夫不吸煙者為高 (約 1.45 倍)。Chen 在 1990 年調查分析台北地區民眾生活環境中的二手煙與肺癌的發生可能有關。但 Lee (1995) 以問卷調查 400 位日本結婚婦女之生活習性與吸煙習慣，結果發現丈夫吸煙之不吸煙婦女，其肺癌發生之危險率與所曝露之二手煙無直接的關係。同時在香港及中國大陸上海地區的研究報告也有相同結果 (Koo et al., 1985; Gao et al., 1987)。以上報告可能由於評估二手煙之曝露標準不同而有相反的結果。另外由於女性的生活中不單單是因丈夫吸煙而曝露到二手煙，而在台灣地區之二手煙和肺癌發生雖然有正的相關性，但二手煙與台灣女性肺癌的關係，仍須進一步的研究。



## (二) 拜香

由於中國傳統文化背景的影響，台灣地區大多數家庭有點香祭祖的習慣，而其生成的煙霧微粒可能是室內污染源之一。在中國大陸南部調查結果發現拜香與鼻煙癌可能有關 (Dobson, 1924)，但是香港與廣州等地的報告卻發現無差異性 (Yu et al., 1986, 1988)。MacLennan et al (1977) 發現室內點燃拜香會增加肺癌發生率。由於中國婦女長時間待在室內，也大多由她們點香祭祖，所以曝露其煙霧的機會較男性高。而有學者研究比較男性因點燃拜香而罹患肺癌的危險機率，結果顯示在女性方面會增加肺癌的罹患率，但在男性卻是降低 (Ger et al., 1993)。同時本實驗室過去研究發現點燃拜香所生成之煙萃取物的基因毒性並不低於香煙 (Chen and Lee, 1996)，因此推測拜香可能是造成中國女性肺癌發生的特殊危險因子之一。但若以曝露拜香的正常狀態來探討與性別之間關係，則發現因曝露拜香煙霧的時間與曝露量皆會受到其他環境因子影響，如：吸煙、飲食等，而不易探討其真正影響。

## (三) 蚊香

另外一種中國家庭常見的空氣污染源，即是夏天防止蚊子叮咬的蚊香。已有研究結果顯示點燃蚊香所產生的煙霧與肺鱗狀上皮癌及肺腺癌的

發展有相關，尤其在持續點燃蚊香的時間，例如：夜晚入睡時，其煙霧與肺癌的發生有明顯的關係 (Chen et al., 1990)。

#### (四) 廚房油煙

已知中國婦女長時間待在廚房中，以煎、炒、煮等方式烹調食物，過去的研究顯示，烹調所產生的油煙與鼻煙癌和肺癌的發生有相關性 (Decoufle et al., 1978)。同時在中國大陸上海的研究也發現：肺癌和烹調的方式 (Wu-Williams et al., 1990; Gao et al., 1987)、烹調的餐數、烹調時的油煙大小、烹調用油都有相關 (Gao et al., 1987)。而長期曝露於烹調油煙的廚師罹患呼吸道癌症的機率也較其他癌症高 (Dubrow et al., 1984; Coggon et al., 1986)。並有新加坡學者發現華人廚師罹患肺癌的機率較高 (Law et al., 1976)。另外由本實驗室過去對油煙的一連串研究結果發現，以中式快炒方式 (stir-frying) 使用三種食用油 (沙拉油、葵花油、豬油) 烹調四種肉類 (豬肉、牛肉、魚肉和雞肉) 時，所產生的油煙其致突變性較油炸方式 (deep-frying) 料理時所產生的油煙為強，其中以中國婦女常用的食用油—沙拉油煎魚時，所產生的油煙量最大，且在原核細胞中的致突變性 (Ames test) 也較其他肉類為強 (Yang Master Thesis, 1995)，同時在 SOS chromotest 和 CHO-K1 細胞之姊妹染色體交換速率的測定上都具有基因毒性。因此進一步將煎魚油煙萃取物 (FOSC, oil smoke condensates from frying fish) 經 HPLC、Ames test、<sup>32</sup>P-postlabeling、LC-MS 的一系列分析

研究，由分析結果得知 FOSC 中含有直接致突變物 1,6-DNP、nitronaphthol 與間接致突變物 PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)，而在以 FOSC 不同濃度處理 (0.1mg 至 1.5mg) 之下，在 TA98 和 TA100 的試驗中，發現 FOSC 所造成之間接致突變性都比直接致突變性強，因此得知 FOSC 的致突變性以間接致突變性為主，同時以相同濃度 FOSC 處理肺線癌細胞- CL-3 細胞時，也會促進 DNA 鍵結物的形成而有濃度效應關係 (Yang Master Thesis, 1997)。接著在動物實驗中，將 FOSC 以氣管內注入法給予大白鼠，進行急性與亞慢毒性的試驗，藉由觀察肺臟組織切片的病理變化及偵測其 DNA 損傷的結果 (PAH-adduct, MDA-adduct, p53 expression, MDM2 expression, BrdU incorporation) 推測 FOSC 會引起肺臟細胞 DNA 傷害，而誘發 p53，MDM2 表現，而改變 p53 對細胞週期的管制能力，使得 BrdU 嵌入量增高，顯示 FOSC 會促進受到傷害之肺臟細胞增生，而有前癌化的現象，因此可進一步推估暴露煎魚油煙可能會造成肺臟細胞有前癌化發生的趨勢 (Yung Master Thesis, 1998)。由流行病學發現荷爾蒙因子於烹調所生成之油煙對女性肺癌可能有此相關 (Gao et al., 1987)，因此另外以相對於避孕藥中雌性素及黃體酮的濃度與 FOSC 同時處理大白鼠，結果在同時給予雌性素 (estrogen) 和黃體酮 (progesterone) 的大白鼠中，可發現肺組織切片中有組織纖維化及類似癌化細胞出現的現象 (Hsu and Lee, unpublished data)，因此可印證 FOSC 在女性肺癌發生上的影響。因此本實驗則主要探討暴露 PAH 環境污染物下，是否雌性素與黃體酮在肺癌細胞和女性肺癌之肺組織對其具有較高感受性中扮演某種角色？

### 三、PAHs

本篇以廣泛存在環境中的污染物且是油煙中主要的間接致突變物—Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)，以探討與女性肺癌的關係。PAH 主要與空氣微粒有關 (Katz et al., 1976; Perera et al., 1981)，因為空氣微粒緊密的中心可防止 PAH 類物質受到光的氧化分解作用 (Krstalovic et al., 1977)，已知 PAH 可經由煤灰、有機化合物等物質的不完全燃燒、矽膠、吸煙、油煙和工業製作的過程中產生 (Chrisp et al., 1980; Hughes et al., 1980)，另外每日進食的食物，如：餅乾、燒、烤牛肉 (Lioy et al., 1988, 1990; Rothman et al., 1990) 和食用油加熱所生成的油煙中都含有 PAH (Li et al., 1994)。PAH 主要藉著空氣微粒大小不同而進入呼吸系統各個部份 (Gerde et al., 1991a; 1991b; 1991c)。此外 PAH 亦可從食道及皮膚接觸而進入體內。當 PAH 進入體內需要經細胞內代謝活化酵素的作用，使 PAH 被代謝活化成 diol epoxide 型的代謝產物 (Sims et al., 1974)，並且此產物能與 DNA 鍵結，形成共價結合的 DNA 鍵結物。DNA 鍵結物已被認定為致癌物引起細胞 DNA 傷害的指標，因為 DNA 鍵結物可反映細胞內對外來物的代謝活化、解毒作用及 DNA 修復之反應相互影響的結果 (Beach et al., 1992)。同時 DNA 鍵結物的形成也與細胞轉型或誘發癌症的發生有關 (Lutz, 1986; Poirier, 1984)。過去的研究藉由分析 DNA 鍵結物的含量變化用來作為生物體曝露環境污染物之生物指標。

在探討 PAH 類之環境污染物導致癌症的影響時，常以 B[a]P 作為研究的對象。已知 B[a]P 是典型的 PAH 類物質，其化學結構上有五個苯環，



對溫度耐受性高，所以廣泛分佈在環境中，如：空氣、土壤、水、植物和食物，其環境中實際含量為空氣，1.3-500 ng/m<sup>3</sup>；土壤，0.8 ng/kg-100 mg/kg；自來水，2.5-9 ng/l；地表水，130-500 ng/l；植物，<150 ug/kg；食物，0.1-20 ug/kg (Koch R, 1991)。可經由不同的曝露源而將 B[a]P 帶進體內。Shou 等人已證實 B[a]P 的代謝是主要經由下面三個途徑進行 (Fig 1)，我們以 7,8-epoxide 為例來說明，(1) 在 B[a]P 的 C7、C8 位置，經 Cytochrome P450 的氧化作用形成 7,8-epoxide，(2) 經 epoxide hydroxylase 將 7,8-epoxide 水解成 (-)trans-7,8-diol，(3) 再經 Cytochrome P450 的酵素作用，在 (-)trans-7,8-diol 的 C9、C10 進行氧化作用，生成 r7-t-8-dihydroxy-t9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (diol epoxide I) 及 r7-t-8-dihydroxy-c9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (diol epoxide II)，即為 BPDE，而 BPDE 會經由與 DNA 形成鍵結物而造成基因的 transversion，對細胞有較強的致突變性和致腫瘤性 (Slaga et al., 1979; Thakker et al., 1985)。同時 Shou 也藉由在 Vaccinia 及淋巴瘤細胞中所表現的 Cytochrome P450s 對 B[a]P 代謝能力不同的研究，得知參與 B[a]P 代謝的 Cytochrome P450，主要有 1A1、1A2、2C9、2C8、3A4 及 2E1，而在 B[a]P 代謝的整個過程中 Cytochrome P450s 的活性大小，依序是 Cytochrome 1A1>1A2>2C9>2C8，在途徑 (1) 主要參與的 Cytochrome P450 是 1A1、1A2、2C9，而途徑 (3) 則是 1A1、1A2、2E1、2C9、2C8、3A4，另外途徑 (2) 之 epoxide hydroxylase (EH) 的參與也直接影響 B[a]P 的代謝。由過去研究結果得知，B[a]P 代謝物主要與 DNA 形成兩種鍵結物，一種是 B[a]P 代謝產物之 BPDE 的 C-10 與 deoxyguanosine 的 N2 共價

形成穩定的 BPDE-10-N2dG 鍵結物 (Sims et al., 1974; Jeffrey et al., 1976)，而另一種是單電子氧化 B[a]P 產生 radiol cation 與 guanine 的 N7 共價結合形成 BP-6-N7G (Cavalieri et al., 1990; Cavalieri and Rogan, 1992)。在動物實驗中我們可在老鼠皮膚鑑定出 BPDE-10-N2dG 鍵結物 (Koreeda et al., 1978)，而在大鼠的尿液與糞便中檢測出 BP-6-N7G (Rogan et al., 1990)。van Schooten et al., (1990) 發現肺癌病人的正常肺組織含有 dG-BPDE-DNA 鍵結物，含量介於 2-42 adducts/10<sup>9</sup> nucleotides 之間，Izzotti et al., (1991) 分析吸煙者之支氣管洗出液內的巨噬細胞 (macrophage) 是否存在 BPDE-DNA 鍵結物，這表示香煙中的 PAH 會在肺組織中形成 DNA adduct。另外 B[a]P 的解毒作用主要是經由 glutathione S-transferase (GST)，這酵素有很多家族，如：alpha、mu、theta 以及 pi，而其中在細胞內參與 B[a]P 的解毒作用則以 GST pi 為主 (Mannervik et al., 1976; Meyer et al., 1991; Swedmark et al., 1992)。而 GST pi 能與 B[a]P 的終產物—BPDE 進行結合作用，進一步抑制其致突變性和致癌性 (Mannervik et al., 1976)。而 GSTM (GST mu type) 則是將 PAHs 之代謝產物 diol epoxide 之 OH 基，去除一分子的 H<sub>2</sub>O，形成 epoxide，減少 diol epoxide。當 GST M 的 subtype-GST M1 缺失時 (GST M1 null)，易發生肺癌 (Zhong et al., 1991; Hayashi et al., 1992; Hirvonen et al., 1993; Anttila et al., 1994)。Kihara 等人 (1995) 研究日本肺癌病患之 GST M null 的基因型與性別之間的關係，結果發現在鱗狀上皮及小細胞肺癌病患中，女性病患中屬 GST M null 基因型者較男性多。因此透過調控體內之代謝活化及解毒功能，使得細胞達到平衡，而正常運作。

#### 四、化學感受性

最近有許多研究顯示，個體之間對於致癌物的代謝和解毒能力不同，會影響個體間產生不同程度的傷害 (Harris et al., 1989)。而曾有學者探討代謝活化、解毒酵素與 DNA 修復的酵素，測其酵素活性可發現肺癌病患有個體差異的表現。Ryberg (1994) 曾比較男女性肺癌患者的吸煙量 and 其所形成之 DNA 鍵結物含量時發現，女性患者在相同吸煙量下，其所形成之 DNA 鍵結物含量較男性為高。Ryberg 及 Zang (1994) 認為女性對於香煙中基因毒物的敏感性較男性為高，才會造成吸煙女性之鍵結物比男性多。另外在不吸煙之台灣女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物仍較男性高 (Chen Master Thesis, 1996)，這結果顯示，台灣女性可能曝露一些特殊污染物，或是可能受體內激素的調控，而對環境污染物的感受性高。

#### 五、女性荷爾蒙

女性體內之激素調控可能影響對環境污染物的感受。已知卵巢組織所分泌之女性荷爾蒙主要有三類：雌性素 (estrogen)，黃體製劑 (progestin) 及雄性素 (androgen)，其中 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol) 是最具代表性的雌性素，由卵巢泡膜的内側和間質細胞分泌。而最主要的黃體製劑是黃體酮 (progesterone) 屬於雄性素及雌性素的前驅物，由卵巢内分泌細胞所產生。

而雄性素在女性體中含量少，另外其他卵巢所分泌的荷爾蒙上有微量的睪固酮 (testosterone)、二氫睪固酮 (dihydrotestosteron) 等，能調控卵巢的正常功能。其中體內自然存在的17 $\beta$ -雌二醇在人體內的生理濃度分別是男性平均含量 8-36ng/ml，女性在濾泡期 10-90ng/ml，中期 100-500ng/ml，黃體期 50-240ng/ml，停經期 10-30ng/ml，而黃體酮的體內含量則是男性 0.3ng/ml，女性的濾泡期 1ng/ml，黃體期 20ng/ml，同時已知雌性素與黃體酮可經由與特異的接受器結合(雌性素受體，Estrogen receptor-ER，黃體酮受體，Progesterone receptor-PR)。雌性素能引起上皮細胞的增生及腫瘤細胞的轉型作用 (Pike et al., 1993; Bernstein et al., 1993; Howell et al., 1994)。已知雌性素會影響一些非目標器官器官癌化的發生，例如：胰臟 ( Redding et al., 1984; Theve et al., 1983)、肝臟 ( Neuberger et al., 1980) 和胃 (Kitaoka , 1983) ，Han 和 Liehr (1994) 發現長期皮下注射給予雄性 Syrian 倉鼠雌性素會引起腎臟癌。同樣的雌性素刺激造成 VP-16 誘發 DNA 斷裂之現象也被發現於人類乳癌細胞中。雌性素可調控哺乳類細胞中肺細胞的分化與成熟 (Sarda et al., 1980)，也可參與胎兒肺細胞的分化與成熟 (Khosla et al., 1983)。因有研究指出低劑量的雌性素會增加肺表面張力素的產生 (Sarda et al., 1980)。許多報導指出性荷爾蒙會影響實驗動物肺腫瘤的發生 (Noronha RFX and Goodall CM 1976, 1983, 1984; Bielschowsky F, 1961)，同時在過去報導中也指出雌性素受體 (estrogen receptor) 可普遍存在於肺鱗狀癌細胞及肺線癌細胞 (Beattie et al., 1985)。已有實驗證實原發肺癌與轉移肺癌組織中有 ER (estrogen receptor)、AR (androgen receptor)、GR (glucocorticoid receptor) 的表現 (Liu et al., 1980; Chaudhuri



et al., 1982; Kobayashi et al., 1982; Jone et al., 1984)。同時藉由分析肺癌組織中女性荷爾蒙受體在肺組織中的表現可進一步了解女性荷爾蒙在肺癌發生的角色。

## 參、研究動機

肺癌自去年已成為台灣地區十大死因之第一位，近年來男性肺癌死亡率的上升趨勢已日趨平緩，但女性肺癌死亡率卻有大幅上升的趨勢 (CDC, 1993)。已知導致肺癌發生最主要的环境因子乃是吸煙 (Schneiderman et al., 1989; IARC, 1986; Zaridze et al., 1986; CDC, 1991)，而台灣地區，女性吸煙人口僅佔 3%。因此吸煙不能完全解釋女性肺癌發生的原因 (Fraumeni et al., 1974; MacLennan et al., 1977; Hinds et al., 1981; Green et al., 1982; Kung et al., 1984; Koo et al., 1985; Gao et al., 1987; Koo et al., 1990)。過去本研究室分析台灣地區肺癌病患非腫瘤組織中之 DNA 鍵結物的含量，結果發現不吸煙之女性之 DNA 鍵結物的含量較男性為高。因此我們欲探討為何在這些不吸煙的女性肺癌病患中，其 DNA 鍵結物含量較男性高，是否除了吸煙以外，尚有其他因子影響女性肺癌病患肺組織中含有高含量之 DNA 鍵結物。

已知與女性肺癌發生有關之影響因子：女性所暴露之特殊環境污染物、女性對環境污染物之化學感受性以及女性荷爾蒙的調控，而本研究室先前分析女性所暴露之烹調油煙的萃取物，結果得知主要致突變物為 PAH 類化合物。由分析 PAH-DNA 鍵結物的 LC-MS 化學鑑定之結果得知，所產生的鍵結物應為 BPDE-N2-dG，已知細胞內代謝活化酵素— Cytochrome P450 能將 PAH 類化合物代謝成具有攻擊 DNA 之代謝產物。

其中典型的 PAH 類化合物—B[a]P 能經 cytochrome P450 、epoxide hydroxylase 及 prostaglandin H synthase 代謝成 BPDE ，而攻擊 DNA 形成 BPDE-N2-dG (Simes et al., 1974; Jeffrey et al., 1976) 。

已知男性與女性之間，除了女性所曝露之環境污染物有可能不同外，其最大的差異可能是體內性荷爾蒙的調控不同，因此我們擬以免疫組織染色法，比較男女性肺癌患者之肺組織切片之雌性素受體 (Estrogen receptor) 與黃體酮受體 (Progesterone receptor) 的表現量有何不同？同時藉由西方墨點法及 RT-PCR 方法分析女性肺癌患者之肺組織中主要參與代謝活化之 CYP1A1 基因的表現是否較男性為高？同時在本研究也在細胞株中研究 B[a]P 及雌性素、黃體酮同時處理肺癌細胞株-CL-3 細胞，以了解雌性素和黃體酮對 B[a]P 所誘發之 CYP1A1 基因表現的影響。本研究的結果將有助於了解女性肺癌患者為何對環境污染物之感受性會較男性為高提供更多毒理學上的證據。

## 肆、材料與方法：

### 一、化學藥品與材料

DMEM medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids (NEAA), trypsin, SuperScript<sup>TM</sup>II RNase HReverse, 100 mM dNTP 購自美國 Life Technology 公司, 細胞培養皿購自丹麥 Nunc 公司, rabbit anti-human CYP1A1 antibody, anti-rabbit HRP IgG 由進階公司代理, estrogen receptor antibody, LSAB kit, DAKO primary antibody diluent, DAB, DAKO pen 購自丹麥 DAKO 公司, progesterone receptor antibody 購自美國 Santa Cruz 公司, EDTA, Tris base, nuclear P1, spleen phosphodiesterase (SPD), Tris-HCl 購自德國 Boehringer Mannheim 公司, ammonium persulfate (APS), N,N,N',N',-tetramethylenediamine, Bio-Rad protein assay 購自美國 Bio-Rad 公司, PVDF membrane, ECL reagent, 購自英國 Amersham Life Science 公司, oligo primer, 100bp ladder, DyNAzyme<sup>TM</sup>IIDNA polymerase, T4 polynucleotide kinase 購自美國 Bio Labs 公司, sucrose, sodium dodecyl sulfate (SDS), isoamyl alcohol 購自日本 WAKO 公司, glycerol, glycine, acrylamide, boric acid sodium phosphate, methanol, KCl, hematoxyline, citrate acid 購自台灣 Merk 公司, micrococcal endonuclease (MN), potato apyrase (PA), bicine

solution, isocitric acid, isocitric dehydrogenase, 7-ethoxyresorufin, resorufin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NP-40, 17 $\beta$ -estradiol, bovine serum albumin (BSA), Tween 20, HEPES, coomassie blue, bromophenol blue 購自美國 Sigma 公司, phenol, chloroform, alcohol, xylene, acetic acid, methanol 購自台灣皓峰公司。

## 二、肺組織之實驗測定

### 2.1 肺癌病患之肺組織檢體來源

肺癌病患之肺組織是由台中榮總胸腔外科所提供。所有組織都是經由外科手術取下位於腫瘤週邊的非腫瘤組織，當組織取下後分裝至 1.5ml eppendorf，並保存於 -80°C 冰箱中，以保持組織的新鮮，以便進行 RNA 的萃取及肺組織微粒體懸浮液之製備。

### 2.2 肺組織切片之免疫組織染色方法

將來自台中榮總病理部所切之 5  $\mu$ m 厚的肺腫瘤組織切片，置於 50-55°C 的烘箱溶蠟，待蠟溶後即立刻將切片置於 Xylene 中脫蠟，再經 100%, 95%, 80%, 75% 的酒精覆水，最後以清水沖 30 秒後，置於 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15分鐘，去除切片中內生性的過氧化酵素，以免干擾後面

的呈色反應。經清水沖 30 秒後，將玻片浸泡在含 0.01% NP-40 的 0.01M citrate buffer (pH6.0) 中，以微波爐加熱方式 (Guesdon et al., 1979; Warnke et al., 1980) 在緩衝液微滾狀態下將細胞膜穿孔，以利抗體進入細胞內。微波爐加熱三次，每次 5 分鐘後，將整個加熱缸置於流水中，沖 30 分鐘。取出切片，放入 TBS buffer (Tris-base 0.01M, Tris-HCl 0.04M, NaCl 0.22M, pH7.4-7.8) 浸泡 5 分鐘以恢復 pH 值，將組織周圍擦乾，以 DAKO pen 畫出組織的範圍，滴上可辨識雌性素受體及黃體酮受體的特異抗體。於 37 °C 反應 90 分鐘後，經 PBS 清洗三次，每次五分鐘。再以 link Ab 及 strepavidin-horseradish peroxidase 個別作用 20 分鐘，經 PBS (KCl 2.7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, NaCl 0.14M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.02M) 清洗三次，每次五分鐘後，以 DAB 呈色 10 分鐘，清水沖洗後，以 Hamatoxylin 為背景染色，再以清水沖 20 分鐘，最後以阿拉伯膠封片。在顯微鏡下觀察其棕色反應並判斷其價數，"-": <10%; "+": 10-25%; "++": 25-50%; "+++": >50%。

### 2.3 肺組織微粒體懸浮液之製備

取適當大小的肺組織，以 1xPBS 清洗數次，加入四倍體積含有 10% glycerol、250 mM sucrose、1 mM dithiothreitol、0.5 mM EDTA、25 mM KCl 和 10 mM HEPES 的緩衝液，利用均質機將肺組織磨碎，經 12000 rpm 4°C 離心 20 分鐘後取上清液即為 S9，置於超

高速冷凍離心機，離心 67000 rpm 4°C 離心 43 分鐘後，吸去上清液，並以適當容量的 20 mM Tris (pH 8.0) 溶液，將沈澱物沖提下來，將此微粒體懸浮液保存於 -80°C 冰箱備用。

## 2.4 蛋白含量之測定

肺組織微粒體懸浮液及細胞微粒體懸浮液 (microsome) 中蛋白質之含量，採用 Bradford 等人之 Bio-Rad Protein 的測定法，原理與方法簡述如下：當試劑中的 Coomassie Brilliant Blue G-250 dye 與 arginine 等胺基酸殘基結合後，以 595 nm 波長測定其吸光值，並以蛋白質標準品 bovine serum albumin (BSA) 所測得的標準曲線來計算樣品中蛋白質的濃度。取相當蛋白量之標準品及樣品 5  $\mu$ l，加入 1 ml 以純水 1:4 稀釋之試劑，混合均勻，靜置於室溫下 5 分鐘，使之反應呈色。在測吸光值前，須再混合均勻，然後以紫外線光譜儀測定在 595 nm 之吸光值。並將蛋白標準品測得之吸光值畫成標準曲線，利用此線計算出樣品蛋白質的相對濃度 (Bradford, 1976)。

## 2.5 肺組織 CYP1A1 蛋白表現量之分析—西方墨點法 (Western blot)

取 50  $\mu$ g 肺組織微粒體，加入適當的 loading dye (0.2M Tris-HCl pH6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 2.88mM 2-mercaptoethanol, 0.2%

bromophenol blue) 混合均勻，100 °C 加熱 5 分鐘使蛋白變性，然後放入含有 SDS 的 10% acrylamide gel 以進行蛋白電泳 (protein electrophoresis)，電泳完畢，將以甲醇潤溼的 PVDF membrane，蓋在以 Tris buffer 浸溼的濾紙上，然後再將膠體平鋪於上面，再蓋上以 Tris buffer 浸溼的濾紙，使膠體與 PVDF membrane 中沒有氣泡產生，置於溼式轉印槽 20V，14 hr，轉印完畢，將 PVDF membrane 置於 5% 脫脂牛奶 / 0.1% Tween 20 / 1×TBS 中室溫下緩慢搖動 1 小時，再以 1000 倍稀釋的一次抗體 (rabbit anti-human CYP1A1 polyclonal antibody) 於室溫反應 1 小時後，以 0.1% Tween 20 / TBS 清洗 membrane 三次，每次 10 分鐘以洗去未結合之抗體，之後經 10000 倍稀釋的二次抗體 (anti-rabbit IgG) 於室溫反應 1 小時，同上清洗步驟清洗五次，每次 5 分鐘，再以 ECL 試劑避光反應 3 分鐘後，於 X 光片上曝光，最後以數位化影像處理系統比較其相對亮度 (IDV=integrity density value)。

## 2.6 肺組織 RNA 之製備

取適當大小之肺組織，置於研碎中，加入少量液態氮將組織磨碎，將磨碎之組織移至 1.5 ml eppendorf，再加入 1 ml TRIzol 試劑，與組織混合均勻後，室溫作用 10 至 15 分鐘，待組織完全水解後，加入 200  $\mu$ l chloroform 充分混合均勻，離心 12000 rpm 4°C、15 分鐘，取上層液至新的 eppendorf，重複此步驟兩次，取上層液加



入 0.5 ml isopropanol，輕輕混合將 RNA 沈澱出來，經 12000 rpm 4°C 離心 20 分鐘後，倒去上清液，加入 1 ml 75% ethanol，洗去殘留的鹽類及 isopropanol，混合後離心 7500 rpm 4°C、5 分鐘，最後吸乾上清液，加入適量之 DEPC 滅菌水，使 RNA 溶解。以波長  $A_{260}$  nm 及  $A_{280}$  nm 測定其吸光值，比值應在 1.7-1.9 之間，RNA 濃度以下列公式計算： $\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{稀釋倍數}$ 。

## 2.7 肺組織 CYP 1A1 mRNA 表現量之分析—RT-PCR

將上述萃取之組織 RNA，取 5  $\mu\text{g}$  RNA、先以 RNA 為模板，Oligo-dT 為 primer，利用 Reverse transcriptase 製作互補之 DNA (cDNA)，經 70°C 反應十分鐘後，置於冰上，再加入 4  $\mu\text{l}$  5 $\times$ First buffer，2  $\mu\text{l}$  0.1M DTT，1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP 混合均勻，在 42°C 反應兩分鐘後，即加入 1  $\mu\text{l}$  Super script<sup>TM</sup>II (200unit) 充分混合，再繼續反應 50 分鐘，最後以 70°C 反應 15 分鐘，即保存於 4°C 冰箱。再以此為模板，以合成的 CYP1A1 cDNA 序列為 primer ( sense: 5'TAGACACTGATCTGGCTGCAG3';

antisense: 5'GGGAAGGCTCCATCAGCATC3')，經 PCR 反應將組織中 CYP1A1 mRNA 的訊息放大，其 PCR 反應條件如下：94°C，5 分鐘後；經 94°C，50 秒；55°C，30 秒；72°C，1 分鐘，重複 30 個 cycle 後，再經 72°C，5 分鐘，最後停在 4°C (Dohr et al., 1995)。將此 PCR

產物經膠體電泳 (2% agarose gel) 分離產物，並以 EtBr (ethidium bromide) 染色觀察結果。

### 三、肺癌細胞株之實驗測定

#### 3.1 台灣肺癌細胞株 CL-3 細胞之來源

台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞是由台大醫院內科楊泮池醫師分離培養出來，並由其提供本研究室使用。

#### 3.2 細胞培養

CL-3 細胞以含有 10 % Fetal bovine serum (FBS)，0.22 % sodium bicarbonate，0.03 % L-glutamine，1mM sodium pyruvate，100 $\mu$ M non-essential amino acid (NEAA) 和 0.03 % penicillin /streptomycin (100U/ml) 之 DMEM medium 培養，置於 5 % 的 37 °C 恆溫培養箱內培養。

#### 3.3 萃取 DNA

將加藥處理後之細胞，以 PBS 沖洗細胞二次後，TE 作用 5 分鐘，再將細胞沖下來，離心 800 rpm，10 分鐘，加入 500 $\mu$ l 的 digestion buffer (100 mM Tris pH8.0, 100mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, 0.1mg/ml Proteinase K)，混合均勻後於 56-60 $^{\circ}$ C 反應 12 至 18 小時，以水解細胞溶出 DNA，之後加入等體積的 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25 : 24 : 1)，緩慢上下混合 5 分鐘，離心 12000 rpm 10 分鐘，輕輕吸取上清液至新的 eppendorf，重複此步驟兩次，吸取上清液至新的 eppendorf，等加入 1/10 倍體積的 3M sodium acetate 和兩倍體積的 ice cold 100% alcohol 後，緩慢上下混合數次，則可見霧狀的 DNA 凝集，再置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱加強沈澱，經離心 12000 rpm，20 分鐘後去上清液，再以 200  $\mu$ l 70% alcohol 洗去鹽類溶液，加入適量的滅菌水將 DNA 溶解後，並保存至 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

#### 3.4 B[a]P-DNA 鍵結物之分析

將上述萃取、純化出來的 DNA 利用  $^{32}$ P-postlabeling 方法分析 PAH-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 加入含有 0.75 unit micrococcal endonuclease (MN) 和 7.75  $\mu$ g spleen phosphodiesterase (SPD) 之 succinate buffer 中，經 37 $^{\circ}$ C 水浴反應 4 小時後，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3'-monophosphate。再加入 6  $\mu$ g NP1 (Nuclease P1), sodium acetate 以及 ZnSO<sub>4</sub> 於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時。然後加入含有 5 units 之 T4

polynucleotide kinase 和  $1 \mu\text{l}$  之  $10 \mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  的混合液，於  $37^\circ\text{C}$  作用 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-  $0.65 \text{ M}$  sodium phosphate (pH 6.0); D3-  $3.6 \text{ M}$  lithium formate,  $8.5 \text{ M}$  urea (pH 3.5); D4-  $0.8 \text{ M}$  lithium chloride,  $0.5 \text{ M}$  Tris base,  $8.0 \text{ M}$  urea (pH 8.0)。展開後的 TLC 片先用 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  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  標記所有核甘酸 (total nucleotides)，然後利用  $40 \text{ mM}$  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  $3 \text{ ml}$  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) = cpm in adducts / cpm in total nucleotides / dilution factor。

### 3.5 B[a]P 代謝物之萃取

將  $2 \times 10^6$  個細胞種於  $10$  公分培養皿上，以  $37^\circ\text{C}$ ， $5\%$   $\text{CO}_2$  培養  $24$  小時後，加藥處理  $1 \mu\text{M}$  B[a]P 或同時處理不同濃度的雌性素

(0.01 ng/ml, 0.25 ng/ml)，另外每盤細胞再各加入 2  $\mu$ l 經 [ $^3$ H] 標定的 B[a]P (radiochemical concentration =185 MBq /ml, 5.0 mCi/ml)，經 24 小時的處理時間後，將其培養液吸至兩個塑膠離心管中(每管各 5 ml)，再各加入 5ml 的萃取液 (乙酸乙酯：丙酮 = 2：1)，混合均勻後經離心 800 rpm，10 分鐘，將其上層液收集至乾淨的塑膠離心管，再將 5ml 的萃取液加入下層液中，依上述方法再萃取一次，最後所收集之上層液利用 Speed vac 將樣本乾燥，加入 1ml 甲醇溶解，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱儲存 (Wroblewski et al., 1988)。

### 3.6 B[a]P 代謝物之分析-HPLC分析

依據等人方法，將上述之 B[a]P 代謝萃取物經 0.2 $\mu$ m 過濾膜 (Gelman, USA) 過濾後，直接注入高效能液相層析儀 (HPLC)( model E-6000, Water, USA)，使用 Merck RP-18 column (5 $\mu$ m, 4.6mm  $\times$  25cm) 沖提，選擇之移動相為 甲醇：水，開始十分鐘之比例為 60：40，而十分鐘至六十分鐘，methanol 的比例則漸漸由 60 %增加至 100 %，固定流速為 1ml/min，分析時間共 60 分鐘。利用標準品的延遲時間以鑑定出 B[a]P 的代謝物 (其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) (Wroblewski et al., 1988)。利用面積積分方式，電腦自動列出其相對 B[a]P 代謝物之 [ $^3$ H] 含量。

### 3.7 CL-3 細胞微粒體懸浮液之製備

將加藥處理後之細胞收下來，以 1ml PBS 製成細胞懸浮液。置於冰浴中以超音波震盪打破細胞膜，再經離心 12000 rpm，20 分鐘後，取上清液至超高速冷凍離心管，離心 67000 rpm，4°C，43 分鐘，倒去上清液後，利用適量的緩衝液 (0.154 M KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol) 將管壁上的細胞微粒體沖下來，混合均勻，保存在 -80 °C。

### 3.8 CYP1A1 之酵素活性測定-EROD (7-Ethoxyresorufin O-deethylase)

取上述之細胞微粒體懸浮液 25  $\mu$ l，加入輔因子溶液 (1 mM NADPH, 15 mM Isocitric acid, 2 units/ml Isocitric dehydrogenase, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) 以提供適當的反應條件，混合均勻後於 37 °C 水浴震盪 5 分鐘。再加入 5 nM 7-ethoxyresorufin 50  $\mu$ l 作為受質避光反應 10 分鐘，反應完畢置於冰浴中並加入 450  $\mu$ l 5% ZnSO<sub>4</sub> 及 450  $\mu$ l 飽和的 Ba(OH)<sub>2</sub> 以沈澱蛋白，經離心 2000g，4°C，15分鐘後。取出上清液加入 5 ml 0.5M glycin-NaOH 中止反應，混合均勻，以螢光光度計在 excitation & emission monochromators =535 nm & 582 nm 條件下，測量記錄其螢光強度，並利用已知濃度之標準品 (resorufin 5nM) 比較

定量代謝產物之生成，以換算其酵素活性。(Lake et al., 1983; Prough et al., 1978)。

## 伍、結果與討論

由本實驗室過去的研究發現，女性肺癌非腫瘤之肺組織中之 DNA 鍵結物較男性患者高，這顯示男女性肺癌患者可能對環境污染物之感受性不同有關。過去流行病學之研究顯示台灣女性肺癌之危險因子包括：二手煙、拜香、蚊香、烹調時產生之油煙等。另外可能是主要參與代謝活化和解毒途徑之基因的多形性和其表現不同所致？以及可能是女性之雌性素 (Estrogen) 及黃體酮 (Progesterone) 扮演某種重要角色。

### 一、台灣地區肺癌組織切片中雌性素受體及黃體酮受體在免疫組織染色的表現

爲了了解雌性素受體 (Estrogen receptor, ER) 和黃體酮受體 (Progesterone receptor, PR) 這兩種受體是否在男女性肺癌患者對環境污染物之感受性上扮演某種重要的角色，首先以免疫組織染色方法 (Immunohistochemistry, IHC) 偵測 15 位女性及 12 位男性肺癌組織切片中 ER 及 PR 的表現。我們以 ER 及 PR 有表現的乳癌組織切片一起進行染色，以作為正控制片 (positive slide)。將光學顯微鏡下所觀察到肺組織切片中棕色反應的程度，記錄其價數表示於 Table 2，並由 Fig 1 的染色照片顯



示 ER 及 PR 的表現位置，其中 PR 表現在細胞質及細胞核，然而 ER 表現在細胞核內，同時由 Table 1 的染色結果得知，15 位女性及 12 位男性之肺癌組織切片上均沒有 ER 的表現，而 PR 則在女性有百分之四十七 (7/15) 的表現，在男性有百分之一十七 (2/12) 的表現，顯然 PR 在女性肺癌組織的表現較男性為強，且具有統計上的意義 ( $p < 0.05$ )。同時比較肺癌組織中 PR 的表現與 DNA 鍵結物的形成是否有關，結果發現 PR 有表現的病患其 DNA 鍵結物較沒有表現的高。

我們將過去學者研究肺癌組織中 ER 與 PR 表現情形列於 Table 3，雖然在 Chaudhui 等人(1982)的研究中發現 ER、PR 在肺癌組織的表現較正常組織中為強，而由 Beattie 等人 (1985) 也指出 ER 普遍存在於肺鱗狀上皮癌和肺腺癌的細胞中，雖鍵結的能力較弱但仍較正常肺組織細胞表現量為多，Kaiser et al (1996) 指出類皮質糖及雌性素受體在女性肺癌組織切片的表現較男性強。但由 Cagle 及 Chaushui 等人 (1990, 1982) 的研究中發現，ER 與 PR 在男女性肺癌組織上的表現沒有差異性，而發現 ER 在肺腺癌組織中的表現較強。此結果雖與我們的結果有異，另外 Su 等人分析台灣高雄地區的非小細胞肺癌病患之 ER 與 PR 的表現，發現其中 ER-/PR+ 的結果佔了 32.7%，作者推論 (1) 可能是 ER 的結構產生變異，而改變其功能，使其不能正常的表現，無法被抗體辨識。此現象在 ER-/PR+ 表現的乳癌組織及細胞株中亦可發現因 exon 4 及 exon 5 的缺失所造成 ER 的結構變異 (Fuqua et al., 1991; Fuqua et al., 1994; Pfeffer et al., 1993)。 (2) 可能是 PR 不受 ER 的誘導而能持續性的表現。最近曾有學者在乳癌組織及胰臟癌組織中也有發現同樣的現象 (Hyder et al., 1987; Wu et al., 1990; Di et al., 1992)。因此我們

推測在所偵測之肺癌組織中也有可能發生 ER 變異與 PR 的持續表現。但需進一步的實驗證實。另外由於分析之肺癌病患太少，或是組織細胞的抗原表現量不同、腫瘤細胞有異質性基因的表現以及所選用之抗體不同。也是造成我們所偵測之 ER 沒有表現的原因，而在實驗中雖以乳癌組織切片做為 ER 有表現的正控制片，以調整合適的染色條件，但在所偵測的肺癌組織切片中仍無法觀察到 ER 的表現。推測也有可能是免疫組織染色的偵測方法敏感度較低，無法偵測到肺癌組織中 ER 的微量表現，若以其他的方法如：prelabeled sucrose gradient (PSG) — 利用緩衝液的蔗糖濃度分佈不同，經離心方式收集受質與受體結合之複合物以偵測受體的量及 dextran-coated charcoal (DCC) — 利用放射線標定的受質以偵測細胞質的受體之較敏感的方法來偵測 ER，可能會提高其敏感度。

不過由以上實驗結果得知，女性肺癌組織切片中 PR 的表現較男性為強，雖然統計上沒有意義，但 PR 的表現似乎和肺組織中 DNA 鍵結物的含量有些相關。因此我們推測女性肺癌組織中 DNA 鍵結物的含量會較男性患者高或許和其 PR 的表現高有關。

## 二、台灣地區肺癌組織中非腫瘤部份之 CYP1A1 基因的表現 — CYP1A1 的蛋白表現 (Western blot) 及 mRNA 的表現 (RT-PCR)

是否因女性肺癌組織中 CYP1A1 基因的表現較高，而導致其 DNA 鍵結

物的形成量較男性高？已知 CYP450 可代謝活化許多外來物，其中 CYP1A1 主要代謝活化多環芳香烴類污染物 (Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH, 環境中常見的污染物)，而典型的 PAH—B[a]P 若經 CYP1A1 的代謝活化會形成具有攻擊 DNA，形成 DNA 鍵結物之代謝物 (BPDE)。由本實驗室之前的研究結果，已知 CYP1A1 的專一抑制劑 ( $\alpha$ -NF,  $\alpha$ -naphthoflavone) 會抑制 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物的形成而誘導劑 ( $\beta$ -NF,  $\beta$ -naphthoflavone) 則會促進 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物的形成 (Chen, Master Thesis, 1996)，因此 CYP1A1 會參與 B[a]P-DNA 鍵結物的形成。由此推測女性肺癌組織中 PAHs 之 DNA 鍵結物的含量較男性高，可能是因肺細胞內主要代謝活化 PAH 之 CYP1A1 基因的表現量增加，進而提高 DNA 鍵結物的形成量。以下兩個實驗分別分析肺癌組織中非腫瘤部份之 CYP1A1 的蛋白及 mRNA 的表現量來探討女性肺癌組織中 CYP1A1 基因的表現與其形成 DNA 鍵結物之間的影響。

我們先將 10 位不吸煙之女性肺癌組織及 5 位不吸煙男性肺癌組織為樣本，取適當大小的組織，萃取其細胞微粒體，並取 50  $\mu$ g 蛋白量的細胞微粒體進行 Western blot 實驗，由 Fig 2 的 CYP1A1 蛋白表現結果得知女性肺癌病患的 CYP1A1 蛋白的表現量是男性的 2.3 倍，在統計上有明顯的差異 ( $p < 0.05$ )。由於過去實驗室分析不吸煙者之女性肺癌組織中 DNA 鍵結物的表現較男性為強。因此我們將這 15 位肺癌病患肺組織之 CYP1A1 蛋白表現量與其 DNA 鍵結物的含量相互比較，結果兩者之間並無相關性，推測可能是因所選擇的病患其鍵結物含量差異太大，而無法看出 CYP1A1 蛋白量與 DNA 鍵結物之間的關係。但若在這些 DNA 鍵結物表現差異不大的病患

中，仍能發現女性肺癌組織中 CYP1A1 蛋白的含量較男性高。推測若將偵測之肺癌組織樣本增多，則男女性患者之間 CYP1A1 蛋白的表現量可能差異會更大。

另外進一步探討是否因男女性 CYP1A1 mRNA 之轉錄作用的表現不同而影響之間 CYP1A1 蛋白表現上的差異。所以以 15 位女性肺癌病患及 7 位男性肺癌病患為樣本，取適當大小的肺組織萃取其 RNA，並進行 RT-PCR 的反應以分析 CYP1A1 mRNA 的表現。結果顯示在 Fig 3，女性肺組織之的表現量較男性為強 (1.7 倍)，但在統計上並不具有顯著意義。

綜合以上結果，女性肺癌組織在 CYP1A1 蛋白及 mRNA 的表現皆較男性高的趨勢。Toussaint 等人 (1993) 也曾以 Western blot 的方法分析人類非小細胞肺癌組織中腫瘤之周圍部份即為我們此次偵測 CYP1A1 蛋白表現所取非腫瘤部份的肺組織，其 CYP1A1 蛋白的表現較高可能是因感受到外來物的刺激而增加其表現量。由我們的實驗結果也可說明女性肺癌的確有較高 CYP1A1 的基因表現，同時 CYP1A1 蛋白量的表現在性別上是有差異的 ( $p < 0.005$ )。

### 三、雌性素與黃體酮對台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞形成 B[a]P-DNA 鍵結物之影響

已知在女性肺癌組織中所產生之 PAH-DNA 鍵結物的含量較男性高，而

由過去研究結果得知 B[a]P 是造成台灣肺癌病患中 PAH-DNA 鍵結物形成之主要 PAH 環境污染物，本實驗先前以 B[a]P 處理不同肺癌細胞株，比較其 PAH-DNA 鍵結物之形成量，結果發現 CL-3 肺腺癌細胞之 PAH-DNA 鍵結物含量遠較其他肺癌細胞株高 (Chen, Master Thesis, 1996)，由此可知 CL-3 細胞對 B[a]P 有較高的敏感性，所以本實驗欲以 CL-3 細胞為其研究細胞，以探討雌性素與黃體酮對 CL-3 細胞中 B[a]P-DNA 鍵結物的形成有何影響？同時以 HPLC 分析雌性素在 CL-3 細胞代謝 B[a]P 所生成之代謝物的分佈有何不同？

為了解 CL-3 細胞中 B[a]P-DNA 鍵結物在何種 B[a]P 濃度範圍具較佳的表現？，先以不同濃度的 B[a]P 處理 CL-3 細胞 24 小時後，萃取其 DNA，取 2 $\mu$ g 之 DNA 進行  $^{32}$ P-postlabeling 分析實驗以偵測 B[a]P 所造成的 DNA 鍵結物含量，由 Fig 4 及 Table 5 之結果顯示，隨著 B[a]P 的濃度增加，DNA 鍵結物含量也隨之增加。其中經 1  $\mu$ M B[a]P 處理之 DNA 鍵結物的生成量已有明顯的增加，所以接著以 1  $\mu$ M B[a]P 同時處理 0.01 ng/ml 至 0.25 ng/ml 之雌性素及 1 ng/ml 至 20 ng/ml 與黃體酮，同樣分析其 B[a]P-DNA 鍵結物的含量，結果發現有加入雌性素與黃體酮時會顯著促進 B[a]P-DNA 鍵結物之形成，且均有濃度效應關係。在生理濃度範圍之高濃度的雌激素所造成 CL-3 細胞的 B[a]P-DNA 鍵結物的含量較低濃度雌性素為高，分別是控制組的 28% 及 173% 倍 (Fig 5, Table 6)，而黃體酮的影響則在 1ng/ml 濃度時，似乎沒有增強其 DNA 鍵結物，僅增加 7% 左右，但高濃度時 (20ng/ml) 則為控制組的 293 倍 (Table 7)。本實驗室過去曾以 2  $\mu$ M B[a]P 及相當於避孕藥成份比例的黃體酮 (18 ng/ml) 和雌性素 (4.3 ng/ml) 同時處理

CL-3 細胞，偵測其 B[a]P-DNA 鍵結物的表現情形，結果發現同時處理黃體酮及雌性素其 B[a]P-DNA 鍵結物的含量較單獨處理 B[a]P 時增高 123%，364%。但由此也可證實此次在處理雌性素與黃體酮時 B[a]P-DNA 鍵結物含量的增加。由以上結果可知雌性素與黃體酮皆會增加 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物的含量。過去有學者將 B[a]P 直接塗抹於 Swiss 種的母鼠或是公鼠的皮膚上，處理一段時間後，發現母鼠皮膚上鍵結物的形成量較公鼠高 (Baer-Dubowska and Alexandrov, 1981; Alexandrov et al., 1983; Rojas et al., 1986)。作者推測可能是母鼠體內激素的調控，使得其形成的鍵結物含量較多。

由以上 DNA 鍵結物的結果得知，雌性素與黃體酮皆會促進 DNA 鍵結物的形成，這與我們在肺組織中探討 PR 的表現與 DNA 鍵結物的結果相符。

#### 四、雌性素對台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞中 B[a]P 代謝物分佈的影響

由以上 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物的分析結果，我們得知雌性素會促進 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物含量。所以我們利用分析 CL-3 之 B[a]P 代謝物的分佈，來探討雌性素是否藉由影響 B[a]P 的代謝活化酵素-CYP450 而改變 B[a]P 代謝物之分佈及含量變化，進而使得 B[a]P 代謝產物-BPDE 攻擊 DNA 的頻率增加。我們以 [<sup>3</sup>H] 標定之 B[a]P 處理 CL-3 細胞，

經乙酸乙酯及丙酮 (2:1) 萃取其細胞外液，將最後溶於甲醇的樣本以 radiation detector 偵測經 HPLC 分離之  $[^3\text{H}]$ -B[a]P 代謝物。結果在 Fig 7 所顯示之 HPLC 分佈圖中，可發現同時處理雌激素及  $1\mu\text{M}$  B[a]P 後，3-OH B[a]P、7,8-diol B[a]P、9,10-diol B[a]P 之 B[a]P 代謝物含量都有較單獨處理 B[a]P 時高，分別增加百分之三十、百分之四十、百分之七十八 (Table 8)。而其中 B[a]P 形成 7,8-diol B[a]P、9,10-diol B[a]P 的代謝物過程中，主要是經由 CYP1A1 的代謝活化 (Roberts-Thomson et al., 1993)，而形成 BPDE，使得 B[a]P-DNA 鍵結物的含量增加。所以在我們同時處理雌性素後，B[a]P 代謝物中 7,8-diol 及 9,10-diol 的含量增加，是否透露出雌性素對 B[a]P 代謝途徑中所參與的 CYP1A1 活化酵素促進其表現的可能性，以致形成 B[a]P-DNA 鍵結物的含量增加。已知 B[a]P 在體內需經 Cytochrome P450、epoxide hydrolase、epoxide reductase、glutathione epoxide transferase、UDP-glucuronate 酵素代謝活化 (Gelboin et al., 1980)，而同時 B[a]P 可至少被代謝成 40 種不同的代謝物，包括 phenols, epoxides, quinones, dihydrodiols, diol epoxides 和 water-soluble conjugates (Gelboin et al., 1976; Yang et al., 1978)，但大部分是解毒產物，而 diol epoxide 是其中被鑑定出主要與 DNA 鍵結的 B[a]P 代謝產物，具有致突變性及致癌性 (Levin et al., 1978; Conney et al., 1982; Kulkarni et al., 1984; Garner et al., 1985)。我們可藉由分析 B[a]P 的代謝物以檢測 diol epoxides 之前驅物 (如：7,8-epoxide, 7,8-diol) 或其解毒產物 (如：3-OH B[a]P, 6-OH B[a]P) 的生成，以了解 B[a]P 代謝產物可能對生物體所造成的致癌性。

而由以上實驗結果得知，B[a]P 代謝物中 3-OH B[a]P 的表現量增加，可

反應 AHH 的酵素活性，因此得知雌激素可能藉由促進 CYP1A1 對 B[a]P 的代謝活化。

#### 五、雌性素在 CL-3 肺腺癌細胞中對 B[a]P 所引起之 CYP1A1 酵素活性表現的影響

由以上 B[a]P 代謝物分析之實驗結果，我們推測雌性素促進 CL-3 細胞之 B[a]P-DNA 鍵結物的表現，可能是藉由調控將 B[a]P 代謝成具有攻擊 DNA 之活化酵素—CYP1A1 基因。因此我們以偵測 EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase) 方法分析 CYP1A1 之酵素活性，由 Fig 8 及 Table 9 結果顯示，0.01ng/ml 和 0.25ng/ml 之兩種雌性素處理，均會增高 CL-3 細胞之 EROD 的酵素活性，因此得知雌性素可能促進 B[a]P 所誘發之 CYP1A1 的酵素活性。已知 CYP450 之酵素活性會依不同種生物及性別不同而有表現上的差異，如在雌性老鼠的肝臟中 AHH (aromatic hydrocarbon hydroxylase) 的酵素活性較雄性老鼠高 (Burki et al., 1973; Kamataki et al., 1986)。DeVito 等人，以 TCDD 處理雌性及雄性大鼠，偵測其 EROD，結果發現無性別上的差異 (DeVito et al., 1996)。藉由 CYP1A1 酵素活性的分析，得知生理濃度之雌性素可能會促進 CYP1A1 酵素活性，影響其代謝活化外來物的能力，而造成女性對 PAH 類污染物的感受性較男性為高。



由肺組織之 CYP1A1 基因表現的分析結果，我們得知女性肺癌組織中 CYP1A1 的表現不論在蛋白或是 mRNA 的表現上，都可能較男性肺癌患者肺組織的表現強的趨勢，而以台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞為其模式細胞，觀察 CL-3 細胞在處理 B[a]P 之典型環境污染物時，外加的女性荷爾蒙是否會改變 CL-3 細胞在 B[a]P-DNA 鍵結物的表現、B[a]P 代謝物的分佈以及對酵素活性的影響。結果顯示，女性荷爾蒙之雌性素在以上的分析中都可能具有正面的影響。似乎和女性病患之肺癌組織中所分析到的 CYP1A1 的基因表現量的結果相近，由此得知女性荷爾蒙可能會透過調控 Cytochrome P4501A1 的表現而促進 PAH 類化合物，而造成女性患者對環境污染物的感受性較強的可能原因。因此女性雌性素及黃體酮於女性引起肺癌上似乎扮演某種重要的角色。

## 陸、參考文獻

- 陳兆平 Chen CP (1996) Analysis of the aromatic DNA adducts in lung tissues from lung cancer patients in Taiwan and effect of 17 $\beta$ -estradiol on the benzo[a]pyrene-DNA adduct levels in CL-3 lung adenocarcinoma cell line. Master Thesis, Institute of Biochemistry. Chung Shan Medical and Dental College.
- 楊忠錡 Yang CC (1995) Genotoxicity of airborne particulates generated from Chinese cooking processing and characterization of their major mutagenic compounds. Master Thesis, Institute of Biochemistry. Chung Shan Medical and Dental College.
- 楊森智 Yang SC (1997) Identification of major mutagenic compounds in oil smoke from cooking and their DNA damages on lung adenocarcinoma CL-3 cells. Master Thesis, Institute of Biochemistry. Chung Shan Medical and Dental College.
- Alavanja MCR, Brown CC, Swanson C, Brownson RC (1993) Saturated fat and lung cancer risk among nonsmoking women in Missouri. *J Natl Cancer Inst.* 85,1906-1916.
- Alexandrov K, Rojas M, Bourgeois Y, 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.
- Amos CJ, Caporaso NE and Western A (1992) Host factors in lung cancer risk: a review of interdisciplinary studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention*. 3, 213.
- Anttila S, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Nurminen T and Vainio H (1994) Combined effect of CYP1A1 inducibility and GSTM1 polymorphism on histological type of lung cancer. *Carcinogenesis* (Lond) 15, 1133-1135.
- Baer-Dubowska W, Alexandrov K (1981) The binding of benzo[a]pyrene to mouse and rat skin DNA. *Cancer Lett* . 13, 47-52.
- Beach AC and Gupta RC (1992) Human biomonitoring and the <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *Carcinogenesis*. 13,1053-1074.
- Beattie CW, Hansen NW and Thomas PA. (1985) Steroid receptors in human lung cancer. *Cancer Res*. 45, 4206-4214.
- Berg I, Overvik E, Nord CE and Gustafsson JA (1988) Mutagenic activity in smoking formed during broiling of lean pork at 200, 250 and 300°C. *Mutat. Res*. 207, 199-204.
- Bernstein L, Ross RK (1993) Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*. 15, 48-65.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brownson RC, Chang JC, Davis JR (1992) Gender and histologic type variations in smoking-related risk of lung cancer. *Epidemiology* 3, 61-64.

Brownson RC, Alavanja MCR, Chang JC (1993) Occupational risk factors for lung cancer among nonsmoking women : a case-control study in Missouri (United States). *Cancer Causes Control* 4, 449-454.

Burki K, Lierbelt AG, Bresnick E (1973) Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mouse tissues from a high and low cancer strain and their F1 hybrids. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 369-380.

Cavalieri EL, Rogan EG, Devanesan PD, Cremonesi P, Cerny RL, Gross ML and Bodell WJ (1990) Binding of benzo[a]pyrene to DNA by cytochrome P-450-catalyzed one-electron oxidation in rat liver microsomes and nuclei. *Biochemistry* 29, 4820-4827.

Cavalieri EL and Rogan EG. (1992) The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmac. Thr.* 55, 183-190.

Chaudhuri PK, Thomas PA, Qalker MJ, Briele HA, Das Gupta TK and Beattie CW (1982) Steroid receptors in human lung cancer. *Cancer Lett.* 16, 327-332.

- Chen CC and Lee H (1996) Genotoxicity and DNA adduct formation of incense smoke condensates: Comparison with environmental tobacco smoke condensates. *Mutat. Res.* 376, 105-114.
- Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, Chen KY, Chen SG, Lai GM, Huang HH and Lee HH (1990) Epidemiologic characteristic and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res.* 10, 971-976.
- Chrisp CE and Fisher GL (1980) Mutagenicity of airborne particles . *Mutat. Res.* 76, 143-164.
- Christou M, Savas U, Schroeder S, Shen X, Thompson T, Gould MN, Jefcoate CR (1995) Cytochromes CYP1A1 and CYP1B1 in the rat mammary gland: cell-specific expression and regulation by polycyclic aromatic hydrocarbons and hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 115, 41-50.
- Coggon D, Pannett B, Osmond C and Acheson ED (1986) A survey of cancer and occupation in young and middle aged men. Cancer of the respiratory tract. *Brit. J. Ind. Med.* 43, 332-338
- Conney AH (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 42, 4975-4977.
- Decoufle P (1978) Further analysis of cancer mortality patterns among workers exposed to cutting oil mists. *J. Natl. Cancer Inst.* 61,1025-

30.

- Deng J and Gao YT (1985) Prevalence of smoking among 110,000 adult residents in Shanghai urban area. *Chinese J. Prev. Med.* 19, 271-274.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hot-spots in p53. *Science* 274, 430-432.
- Department of Health, Executive Yuan, Republic of China (1996) Public Health in Taiwan area, Republic of China.
- DeVito MJ, Beede LE, Menache M, Birnbaum LS (1996) Relationship between CYP1A enzyme activities and protein levels in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Toxicol. Environ. Health.* 47, 379-394.
- Di LA, Linsalata M, Cavallini A, Messa C and Russo F (1992) Sex steroid hormone receptors, epidermal growth factor receptor and polyamines in human colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 35, 305-309.
- Dobson WH (1924) Cervical lympho-sarcoma. *Clin. Med. J.* 38, 786-787.
- Dohr O, Vogel C, Avel J (1995) Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch. Biochem.*

*Biophys.* 321, 405-412.

- Dubrow R and Wegmen DH (1984) Cancer and occupation in Massachusetts: A death certificate study. *Am. J. Int. Med.* 6, 207-230.
- Epstein RJ, Smith PJ, Watson JV and Bleehen NM (1988) Characterization of VP-16-induced DNA cleavage in estrogen-stimulated human breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* 57. 445-450.
- Frank AL (1987) Occupational cancers of the respiratory tract. In: Brandt-Rauf PW, ed. Occupational Medicine-State of the Art Reviews. *Phildelphia : Harley & Belfus* 71-83.
- Fraumeni JF Jr, Mason TJ (1974) Cancer mortality among Chinese Americans, 1950-1969. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 659-665.
- Fuqua SAW (1994) Estrogen rceptor mutagenesis and hormone resistance. *Cancer* (Suppl) 74, 1026-1029.
- Fuqua SAW, Fitzgerald DC, Chamnes GC, Tandon AK, McDonnell DP, Nawaz Z, O'Malley BW and McGuier WL (1991) Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res.* 51, 741-743.
- Gao YT, Blot WJ, Zeng W, Ershow AH, Hsu CW, Levin LI, Zhang R, Fraumeni JF JR (1987) Lung cancer among Chinese women. *Int. J. Cancer* 40, 604-609.

- Garner RC, Stanton CA, Martin CN, Harris CC and Grafstrom RC (1985)  
Rat and human explant metabolism, binding studies, and DNA adduct  
analysis of benzo[a]pyrene and its 6-nitro derivative. *Cancer Res.*  
45, 6225-6231.
- Gelboin HV (1908) Benzo[a]pyrene metabolism, activation and  
carcinogenesis : role and regulation of mixed function. *Phsiol. Res.*  
60, 1107-1166.
- Gelboin HV, Okuda T, Selkirk JK, Nemoto N, Yang SK, Wiebel FJ,  
Whitlock J, Rapp HJ and Bast RC (1976) Benzo[a]pyrene  
metabolism : enzymatic and liquid chromatographic analysis and  
application to human liver, lymphocytes, and monocytes. In  
Montesano R, Bartsch H and Tomatis L.(eds) Screening Tests in  
Chemical Carcinogenesis. *IARC Monograph* Vol.12, pp.225-247.
- Gelboin HV (1980) Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and  
carcinogenesis : role and regulation of mixed-function oxidases and  
related enzymes. *Phys. Rev.* 60, 1107-1165.
- Ger LP, Hsu WL, Chen KT and Chen CJ (1993) Risk factors of lung cancer  
by histological category in Taiwan. *Anticancer Res.* 13, 1491-1500.
- Gerde P, Medinsky MA and Bond JA (1991a) *Toxicol. Appl Pharmacol.*  
108, 1-13.
- Gerde P, Cheng YS and Medinsky MA (1991b) *Fundam. Appl. Toxicol.* 16,  
330-336.



- Gerde P, Medinsky MA and Bond JA (1991c) *Toxicol. Appl. Pharmacol* 107, 239-252.
- Green JP, Brophy P (1982) Carcinoma of the lung in non-smoking Chinese women. *West J Med.* 136, 291-294.
- Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S (1979) The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1131-1139.
- Han X and Liehr JG (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.
- Harris CC (1989) Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* (Lond) 10, 1563-1566.
- Hayashi S, Watanabe J and Kawajiri K (1992) High susceptibility to lung cancer analysed in terms of combined genotypes of P4501A1 and  $\mu$ -class glutathione S-transferase genes. *JPN. J. Cancer Res.* 83, 868-870.
- Hinds MW, Stemmermann GN, Yang HY, et al. (1981) Differences in lung cancer risk from smoking among Japanese, Chinese and Hawaiian women in Hawaii. *Int. J. Cancer* 27, 297-302.
- Hirayama T (1981) Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk

- of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J* 282, 183-185.
- Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K Anttila S and Vainio H (1993) The GSTM1-null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* (Lond) 14, 1479-1481.
- Howell AE, Anderson E, Laidlaw I (1994) Cyclical activity and aging of the human breast: clues to assessment of risk and strategies for prevention. In: *Endocrine Therapy of Breast Cancer* (Howell A, ed). New York: Springer-Verlag. 27-46.
- Hughes TJ, Pellizzar E, Little L, Sparacino C and Kolber A (1980) Ambient air pollutants: collecting chemical characterization and mutagenicity testing. *Mutat. Res.* 76, 51-83.
- Hyder SM, Kohrs FP and Wittliff JL (1987) Progestin receptors from tissues either exhibiting or lacking estrogen response mechanisms : comparison of conventional and high-performance liquid chromatography methodology. *J. Chromatogr.* 397, 269-278.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1986) IARC monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Tobacco Smoking, Vol 38, IARC, Lyon , France.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1987) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement 7 Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Adapting

of IARC Monographs Volumes 1 to 42, IARC Lyon France.

Jeffrey AM, JennetteKW, Blobstein SH, Weinstein IB, Beland FA, Harver RG, Kasai H, Miura I and Nakanishi K (1976) Benzo(a)pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: Structure of a benzo(a)pyrene tetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 5714-5715.

Izzotti A, Rossi GA, Bagnasco M and deFlora S (1991) Benzo(a)pyrene dioepoxide-DNA adducts in alveolar macrophages of smokers. *Carcinogenesis* 12, 1281-1285.

Jones LA, Blocker SH, Rusch VH and Mountain CF (1984) Specific estrogen binding protein in human lung cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 208.

Kaiser U, Hofmann J, Schilli M, Wegmann B, Klotz U, Wedel S, Virmani AK, Wollmer E, Branscheid D, Gazdar AF and Havemann K (1996) Steroid-hormone receptors in cell lines and tumor biopsies of human lung cancer. *Int. J. Cancer* 67, 357-364.

Kamataki T, Maeda K, ShimadaM, Kato R (1986) Effects of phenobarbital, 3-methycholanthrene and polychlorinated biphenyls on sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes of rats. *J. Biochem.* 99, 841-845.

Katz M and Pierce RC (1976) Quantitative distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons in relation to the particle size of urban

particulates. In Freudenthal RI and Jones PW. (eds) Polynuclear aromatic hydrocarbons: chemistry, metabolism and carcinogenesis. Raven Press, New York, Vol. 1, pp.413-429.

Khosla SS. Brehier A. Eisenfeld AJ. Ingleson LD. Parks PA. Rooney SA (1983) Influence of sex hormones on lung maturation in the fetal rabbit. *Biochimica. Biophysica Acta.* 750, 112-26.

Kihara M, Noda K and Kihara M (1995) Distribution of GST M1 null genotype in relation to gender, age and smoking status in Japanese lung cancer patients. *Pharmacogenetics* 5, S74-S79.

Kitaoka H (1983) Sex hormone dependency and endocrine therapy in diffuse carcinoma of the stomach. *Japanese Journal of Cancer & Chemotherapy.* 10, 2453-60.

Kobayashi S, Mizuno T, Tobioka N, Ichimura H, Samoto T, Tanaka H, Masaoka A, Qakabayashi S, Umemura S, Fukuoka H and Nagai H (1982) Sex steroid receptors in diverse human tumors. *Gann* 23, 439-445.

Koch R (ed) (1991) *Umwetchemikalien*, 2nd ed. Verlag Chemie, Weinheim , pp 338-347.

Koo LC, Ho JH and Lee N (1985) An analysis of some risk factors for lung cancer in Hong Kong. *Int. J. Cancer* 35, 149-155.

Koo LC, Ho JH (1990) Worldwide epidemiological patterns of lung cancer

in nonsmokers. *Int. J. Epidemiol.* 19, S14-S23.

- Koreeda M, Moore PD, Wislocki PG, Levin W, Conney AH, Yagi H and Jerina DM (1978) Binding of benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity. *Science* (Washington, D.C.) 199, 778-781.
- Krstalovic AM, Rosie DM and Brown PP (1977) Distribution of some atmospheric polynuclear aromatic hydrocarbons. *Am. Lab. Airfield* 9, 11-18.
- Kulkarni MS and Anderson MW (1984) Persistence of benzo[a]pyrene metabolite: DNA adducts in lung and liver of mice. *Cancer Res.* 44, 97-101.
- Kung IR, So KF, Lam TH (1984) Lung cancer in Hong Kong Chinese : mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer* 50, 381-388.
- Lake BG and Paine AJ (1983) Induction of hepatic cytochrome P-450 and drug metabolism by metyrapone in the rat : relevance to its effects in rat-liver cell culture. *Xenobiotica* 13(12), 725-730.
- Law H and Day NE (1976) Incidence rates of specific histological types of lung cancer in Singapore Chinese dialect group and their aetiological significance. *Int. J. Cancer* 17, 304-309.
- Lee H, Yur JH, Shiow SJ and Lin JY (1988) The mutagenic activity of smog

airborne particles collected from combustion products. *J. Chin. Oncol. Soc.* 4, 1-8.

Lee PN (1995) "Marriage to a smoker" may not be a valid marker of exposure in studies relating environmental tobacco smoke to risk of lung cancer in Japanese non-smoking women. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 67, 287-294.

Levin W, Wood AW, Wislocki PG, Chang RL, Kapitulnik J, Mah HD, Yagi H, Jerina DM and Conney AH (1978) Mutagenicity and carcinogenicity of beno[a]pyrene derivatives. In Gelboin HV and Ts'o POP (eds). *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer: Environment, Chemistry and Metabolism.* Academic Press. New York, Vol 1, pp. 189-202.

Li CS, Lin WH and Jenq FT (1993) Characterization of outdoor submicron particles and selected combustion sources of indoor particulates. *Atmos. Environ.* 27B, 413-424.

Li SG, Pan DH and Wang GX (1994) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch. Environ. Health* 49, 119-122.

Lioy PJ and Greenberg A (1990) Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Indust. Health* 6, 209-223.

Liu SH, Otal-Brun M and Webb TE (1980) Glucocorticoid receptor in

- human tumors. *Cancer lett.* 10, 269-275.
- 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.
- Lubin JH, Blot WJ (1984) Assessment of lung cancer risk factor by histologic category. *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 383-389.
- Lutz WK (1986) Quantitative evaluation of DNA binding data for risk estimation and for classification of direct and indirect carcinogens. *Clin. Oncol.* 112, 85-91.
- MacLennan R, Costa J, Day NE, Law CH, Ng YK and Shanmugaratnam K (1977) Risk factor for lung cancer in Singapore Chinese, a population with high female incidence rates. *Int. J. Cancer* 20, 854-860.
- Mannervik B, Danielson UH (1976) Glutathione transferase structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 281-334.
- McLemore TL, Adelberg S, Liu MC, McMahon NA, Yu SJ, Hubbard WC, Czerwinski M, Wood TG, Storeng R and Lubber RA (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1333-1339.
- Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B. (1991) Theta, a new class of glutathione transferase purified from rat and

man. *Biochem. J.* 274, 409-414.

Mori M, Tezuka F, Chiba R, Funae Y, Watanabe M, Nukiwa T, Takahashi T (1996) Atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human lung: their heterology in form and analogy in immunohistochemical characteristics. *Cancer.* 77(4), 665-674.

Nebert DW, Puga A and Vasioliou V (1993) Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible Ah gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Immunomodulating Drugs* 685, 624-640.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman FJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, and Nebert DW (1996) P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping , accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.

Neuberger J. Portmann B. Nunnerley HB. Laws JW. Davis M. Williams R (1980) Oral-contraceptive-associated liver tumours: occurrence of malignancy and difficulties in diagnosis. *Lancet.* 1, 273-6.

Okey AB, Riddick DS and Harper PA (1994) The Ah receptor : mediator of the toxicity of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol. Lett.* 70, 1-22.

Perera F (1981) Carcinogenicity of airborne fine particulate benzo[a]pyrene : an appraisal of the evidence and the need for control. *Environ. Health. Perspect.* 42, 163-185.



- Pfeffer U, Fecarotta E, Castagnetta L and Vidali G (1993) Estrogen receptor variant messenger RNA lacking exon 4 in estrogen-responsive human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 53, 741-743.
- Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF (1993) Estrogens, progestones, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 15, 17-35.
- Poirier MC (1984) The use of carcinogen-DNA adduct antisera for quantitation and localization of genomic damage in animal models and human population. *Environ. Mutagen.* 6, 879-887.
- Prough RA, Burke MD and Mayer RT (1978) Direct fluorometric methods for measuring mixed function oxidase activity. In *Methods in Enzymology*. Vol. 52, Fleischer S and Packer L (eds). Academic Press, New York, p.372.
- Redding TW, Schally AV (1984) Inhibition of growth of pancreatic carcinomas in animal models by analogs of hypothalamic hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 81, 248-52.
- Reddy MV, Bleicher WT, Blackburn GR and Mackerer CR (1990) DNA adduction by phenol, hydroquinone, or benzoguinone 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.
- Roberts-Thomson SJ, McManus ME, Tukey RH, Gonzalez FF and Holder

- GM (1993) The catalytic activity of four expressed human cytochrome P450s towards Benzo[a]pyrene and the isomers of its proximate carcinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1373-1379.
- Rogan EG, RamaKrishna NVS, Higginbotham S, Cavalieri EL, Jeong H, Jankowiak R and Small GJ (1990) Identification and quantitation of 7-(benzo[a]pyrene-6-yl)guanine in the urine and feces of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 441-444.
- Rojas M, Baer-Dubowska W, Alexandrov K (1986) Comparison of benzo[a]pyrene-DNA adduct levels in mouse and rat epidermis and dermis. *Cancer Lett.* 30, 35-39.
- Rothman N, Oirier MC, Baser ME, Hansen JA, Gentile C, Bowman ED and Strickland PT (1990) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells during consumption of charcoal-broiled beef. *Carcinogenesis* 11, 1241-1246.
- Ryberg D, Hewer A, Phillips DH and Haugen A (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.* 54, 5801-5803.
- Sarda AK. Barnes MA. Nair RM (1980) <sup>125</sup>I-labeled gonadoliberin and high specific activity and immunoreactivity: method of iodination and rapid separation. *Clinical Chemistry.* 26, 573-8.

- Schneiderman MA, Davis DL, Wagener DK (1989) Lung cancer that is not attributable to smoking. *J. Am. Med. Assoc.* 261, 2635-2636.
- Slaga TJ, Bracken WJ, Gleason G, Levin W, Tagi H, Jerina DM and Conney AH (1979) Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides. *Cancer Res.* 39, 67-71.
- Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, and Hewer A (1974) Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* (London) 252,326-328.
- Swedmark D, Romert L, Morgenstern R and Jenssen D (1992) Studies on glutathione transferase belonging to class pi in cell lines with different capabilities for conjugating (+)-7 $\beta$ ,8 $\delta$ -dihydroxy-9 $\delta$ ,10 $\delta$ -oxy-7,8,9,10-tetrahydro benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis.* 13, 1719-1723.
- Teschke K, Hertzman C, Netten CV, Lee E, Morrison B, Cornista A, Lar G and Hundal (1989) Potential exposure of cooks to airborne mutagens and carcinogens. *Environ. Res.* 50, 296-308.
- Thakker DR, Tagi H, Levin W, Ward AW, Conney AM and Jerina DM (1985) Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolic activation to ultimate carcinogens. In Anders.M.W (eds). *Bioactivation of Foreign Compounds.* Academic Press, New York, pp.177-242.
- Theve NO. Pousette A. Carlstrom K (1983) Adenocarcinoma of the

pancreas--a hormone sensitive tumor? A preliminary report on Nolvadex treatment. *Clinical Oncology*. 9, 193-7.

Toussaint C, Albin N, Massaad L, Grunenwald D, Parise O, Morizert JJ, Gouyette A, and Chabot GG (1993) Main drug and carcinogen-metabolizing enzyme systems in human non-small cell lung cancer and peritumoral tissues. *Cancer Res*. 53, 4608-4612.

van Schooten FJ, Hillebrand MJ, van Leewen FE, Lutgerink JT, van Zandwijk N, Jansen HM and Kriek E (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis* 11, 1677-1681.

Warnke R. Levy R (1980) Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 771-776.

Wheeler CW and Guenther TM (1991) Cytochrome P450-dependent metabolism of xenobiotics in human lung. *J. Biochem.Toxicol.* 6,163-169.

Wroblewski VJ, Gessner T and Olson JR (1988) Qualitative and quantitative differences in the induction and inhibition of hepatic benzo[a]pyrene metabolism in the rat and hamster. *Biochemical Pharmacology* 378, 1509-1517.

Wu CW, Chi CW, Chang TJ, Lui WY and Peng FK (1990) Sex hormone receptors in gastric cancer. *Cancer* 65, 1396-1400.

Wu-Williams AH, Dai XD, Blot W, Xu ZY, Sun XW, Xiao HP, Stone BJ,

- Yu SF, Feng YP, Ershow AG et al., (1990) Lung cancer among women in north-east China. *Br. J. Cancer* 62, 982-987.
- Yang CC, Jeng SN and Lee H (1998) Characterization of the carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline in cooking aerosols under domestic conditions. *Carcinogenesis*. 19, 359-363.
- Yang SK, Deutsch J and Gelboin HV(1978) Benzo[a]pyrene metabolism: activation and detoxification. In Gelboin HV and Ts'o POP (eds), *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*. Academic Press, New York, Vol 1, pp 205-231.
- Yu MC, Ho JHC, Lai SH and Henderson BE (1986) Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma : report of a case-control study in Hong Kong. *Cancer Res.* 46, 956-961.
- Yu MC, Mo CC, Chong WX, Yeh FS and Henderson BE (1988) Preserved foods and nasopharyngeal carcinoma: case-control study in Guangxi, China. *Cancer Res.* 48, 1954-1959.
- Zaridze D, Peto R (1986) Tobacco: a major international health hazard. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer . (IARC Scientific Publication no. 74)
- Zhong S, Howie AF, Ketterer B, Taylor J, Hayes JD, Beckett GJ, Wathen CG, Wolf CR and Spurr NK (1991) Glutathione S-transferase  $\mu$  locus; use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* (Lond) 12, 1533-1537.

Table 1. The study subjects of nonsmoking lung cancer patients.

patient No.	sex	age	Tumor		CYP1A1			GST M1 polymorphism <sup>c</sup>	Total DNA adduct /10 <sup>8</sup> nucleotides	ER	PR
			type <sup>a</sup>	stage	MspI <sup>b</sup>	mRNA	protein				
1	F	70	SQ	I	W	0.80	8602	-	11.63±0.26	-	+++
2	F	55	A	I	H	0.56	7140	-	32.90±2.60	-	+
3	F	73	A	I	H	0.29	1806	-	12.46±1.50	-	-
4	F	60	A	IIIa	W	0.27	ND	-	34.70±2.40	ND <sup>d</sup>	ND
5	F	45	A&SQ	IV	M	0.88	15400	-	70.78±3.13	-	-
6	F	65	A	I	W	0.8	ND	-	52.52±2.10	ND	ND
7	F	72	A	I	M	0.31	ND	+	165.92±8.65	-	+
8	F	37	SQ	I	W	0.28	4176	+	51.70±2.95	-	+
9	F	64	A	I	W	0.25	13156	+	25.81±9.31	-	+++
10	F	40	A	IIIa	H	0.88	ND	+	58.91±3.57	-	+++
11	F	58	A	IIIa	H	0.67	3744	-	97.10±10.60	-	-
12	F	76	A	IIIb	H	0.75	7956	+	99.85±4.30	-	-
13	F	58	SQ	?	H	1	4704	+	48.28	-	-
14	F	71	?	?	W	0.39	ND	+	78.24±13.15	-	-
15	F	66	A	IV	H	0.94	4116	+	50.32±2.33	ND	+

(continued)-nonsmoke patients

patient No.	sex	age	Tumor		CYP1A1			GST M1 polymorphism <sup>c</sup>	Total DNA adduct /10 <sup>8</sup> nucleotides	ER	PR
			type <sup>a</sup>	stage	MspI <sup>b</sup>	mRNA	protein				
16	M	77	SQ	I	M	-	3312	+	43.70±2.06	-	-
17	M	64	A	I	H	-	1806	-	42.15±2.07	-	-
18	M	57	A&SQ	IIIa	H	-	4128	-	12.14±0.96	-	+++
19	M	55	A	IIIa	W	-	2576	+	56.23±6.30	-	-
20	M	62	A	I	H	-	3864	-	90.48±10.8	-	-

(continued)-smoke patients

patient No.	sex	age	Tumor		CYP1A1			GST M1 polymorphism <sup>c</sup>	Total DNA adduct /10 <sup>8</sup> nucleotides	ER	PR
			type <sup>a</sup>	stage	MspI <sup>b</sup>	mRNA	protein				
21	M	71	SQ	IIIa		0.38	-	154.24	-	+++	
22	M	53	SQ	I		0.31	+	122.66±7.23	-	-	
23	M	69	SQ	I	W	0.11	-	120.76±2.4	-	+	
24	M	66	SQ	IIIa	W	0.39	-	114.43±6.71	ND	-	
25	M	69	SQ	IIIa	H	0.55	-	7.72±0.98	-	-	
26	M	70	SQ	IIIa	H	0.5	-	7.72±0.36	-	-	
27	M	61	SQ	II	W	1.1	+	14.97±0.95	-	-	

a SQ, squamous cell carcinoma; A, adenocarcinoma.

b W, wild type; H, heterozygote; M, mutant type.

c -, null type; +, wild type.

d ND, not detected.



Table 2. Comparison of immunohistochemical expression percentages of ER and PR in tumor specimens between male and female lung cancer patients.

Sex	ER		PR		Positive expression (%)
	-	+	-	+	
Male (n=12)	12	0	10	2	16.7
Female (n=15)	15	0	8	7	46.7

Immunostaining criteria : - : <10%; + : 10-25%; ++ : 25-50%; +++ : >50%

Table 3. Comparison of ER and PR expression in lung tumor specimen from lung cancer patients in previous reports.

Previous reports	ER		PR		Detection method	Reference
	M	F	M	F		
1	4/25 (16)		3/25(12)		DCC	Chaudhuri (1982)
2	6/15 (40)		2/15(13.3)		DCC	Beattie (1985)
3	2/12 (16.7)	1/7 (14.3)	4/12 (33.3)	2/7 (28.6)	DCC	Cagle (1990)
4	2/39 (5.1)	1/10 (10.0)	14/39 (35.9)	3/10 (30.0)	IHC	Su (1996)
5	0/36 (0.0)	4/16 (25)	13/36 (36.1)	10/16 (62.5)	IHC	Kaiser (1996)
6	0/12 (0.0)	0/15 (0.0)	2/12 (16.7)	7/15 (46.7)	IHC	Present data

The value in parenthesis is the percentage of protein expression.

DCC= dextran-coated charcoal.

IHC= immunohistochemistry.

Table 4. The CYP 1A1 protein expression and total DNA adduct levels in non-tumor lung tissues of all treated male and female lung cancer patients.

Paitents no	Sex	Total DNA adducts /10 <sup>8</sup> nucleotides	CYP1A1(IDV <sup>a</sup> )
1	F	51.70±2.95	4176
2	F	99.85±4.30	7956
3	F	97.10±10.60	3744
4	F	70.78±3.13	15400
5	F	50.32±2.33	4116
6	F	48.28	4704
7	F	32.90±2.60	7140
8	F	25.81±9.31	13156
9	F	12.46±1.50	1806
10	F	11.63±0.26	8602
11	M	90.48±10.8	3864
12	M	56.23±6.30	2576
13	M	43.70±2.06	3312
14	M	42.15±2.07	1806
15	M	12.14±0.96	4128

a : IDV-Integrated density value was determined by densitometers as text described.

Table 5. The relative adduct labeling of B[a]P-DNA adduct levels in CL-3 lung adenocarcinoma cells treated by various concentrations of B[a]P.

B[a]P ( $\mu$ M)	DNA adducts/ $10^8$ nucleotides
0.4	46.38 $\pm$ 2.46
1	169.65 $\pm$ 6.54
2.5	470.27 $\pm$ 25.47
5.0	228.61 $\pm$ 10.15

\*  $5 \times 10^5$ /ml of CL-3 cells were plated in 10 cm dish overnight and the was treated with various concentrations of B[a]P for 24 hr. The DNA was isolated from the cells and the DNA adduct levels were evaluated by  $^{32}$ P-postlabeling.

Table 6. Effects of estradiol on the formation of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells.

17 $\beta$ -estradiol (ng/ml)	DNA adduct levels/10 <sup>8</sup> nucleotides	PC(%)
0	155.03 $\pm$ 39.74	
0.01	198.57 $\pm$ 72.75	128.09
0.25	423.07 $\pm$ 226.20	272.90

\* The CL-3 cells were simultaneously treated with 1 $\mu$ M B[a]P and 0.01 or 0.25ng/ml of 17 $\beta$ -estradiol for 24hr, and then the DNA was isolated for the variation of DNA adducts by <sup>32</sup>P-postlabeling.

\* PC(%), percent of control =( DNA adduct levels in the presence of B[a]P and 17 $\beta$ -estradiol/ DNA adduct levels in the presence of B[a]P alone) x100

\* Wilcoxon rank sums test, P < 0.05.

Table 7. Effects of estradiol on the formation of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells.

Progesterone (ng/ml)	DNA adduct levels/ $10^8$ nucleotides	PC(%)
0	115.93	
1	125.11	107.92
20	340.50	293.74

\* Cells were simultaneously treated with  $1\mu\text{M}$  B[a]P and various concentrations of progesterone for 24hr, and then the DNA was isolated for the variation of DNA adducts by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling.

\* PC(%), percent of control = ( DNA adduct levels in the presence of B[a]P and progesterone/ DNA adduct levels in the presence of B[a]P alone) x100

\* Wilcoxon rank sums test,  $P < 0.05$

Table 8. The amounts of B[a]P metabolites formed after incubation of [<sup>3</sup>H]-B[a]P and 17 $\beta$ -estradiol in CL-3 lung adenocarcinoma cells analysis by HPLC.

B[a]P ( $\mu$ M)	Estradiol (ng/ml)	The production of B[a]P metabolites (PC, %)				Total
		9,10-diol	7,8-diol	3,6-diol	3-OH	
1	0	4216 <sup>a</sup>	3303	452	1137	9108
1	0.01	5365 (127)	3038 (92)	408 (90)	1007 (89)	9818 (107)
1	0.05	8937 (212)	4755 (144)	755 (167)	1553 (137)	16000 (176)
1	0.25	7491 (178)	4616 (140)	464 (103)	1474 (130)	14045 (154)

\* PC(%), percent of control =(The amounts of B[a]P metabolite in the presence of 17 $\beta$ -estradiol - the amount of B[a]P metabolite in the absence of 17 $\beta$ -estradiol) x100.

a : The value was the peak area of metabolite from HPLC analysis.

Table 9. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on cytochrome P-4501A1-linked ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in CL-3 cells induced by B[a]P.

B[a]P ( $\mu$ M)	17 $\beta$ -estradiol (ng/ml)	EROD Activity (pmol/min/mg)	PC(%)
1	0	0.191 $\pm$ 0.006	
0	0.25	0.058 $\pm$ 0.004	
1	0.01	0.215 $\pm$ 0.006	112.57
1	0.25	0.553 $\pm$ 0.006	289.53

\* The fluorescence of solvent control(DMSO) was 0.262  $\pm$  0.006.

\* The EROD activity of 10 $\mu$ M  $\beta$ -NAF ( $\beta$ -naphthoflavone) was 0.76  $\pm$  0.028 pmol/min/mg.

\* Wilcoxon rank sums test, P < 0.05



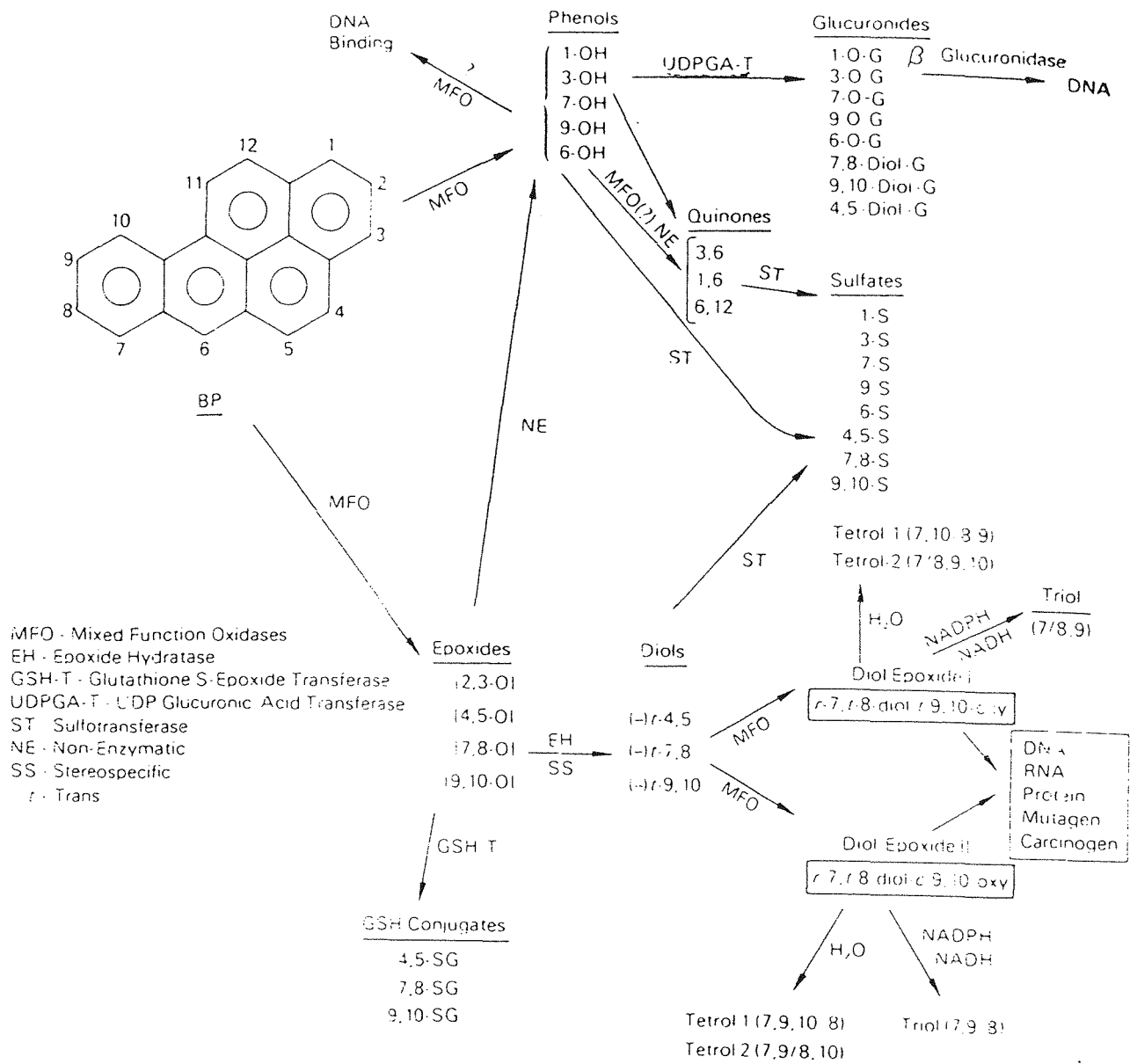


FIG. 3. Metabolism and activation of benzo[a]pyrene.

Fig 1. The figure was obtained from Gelboin (1980).

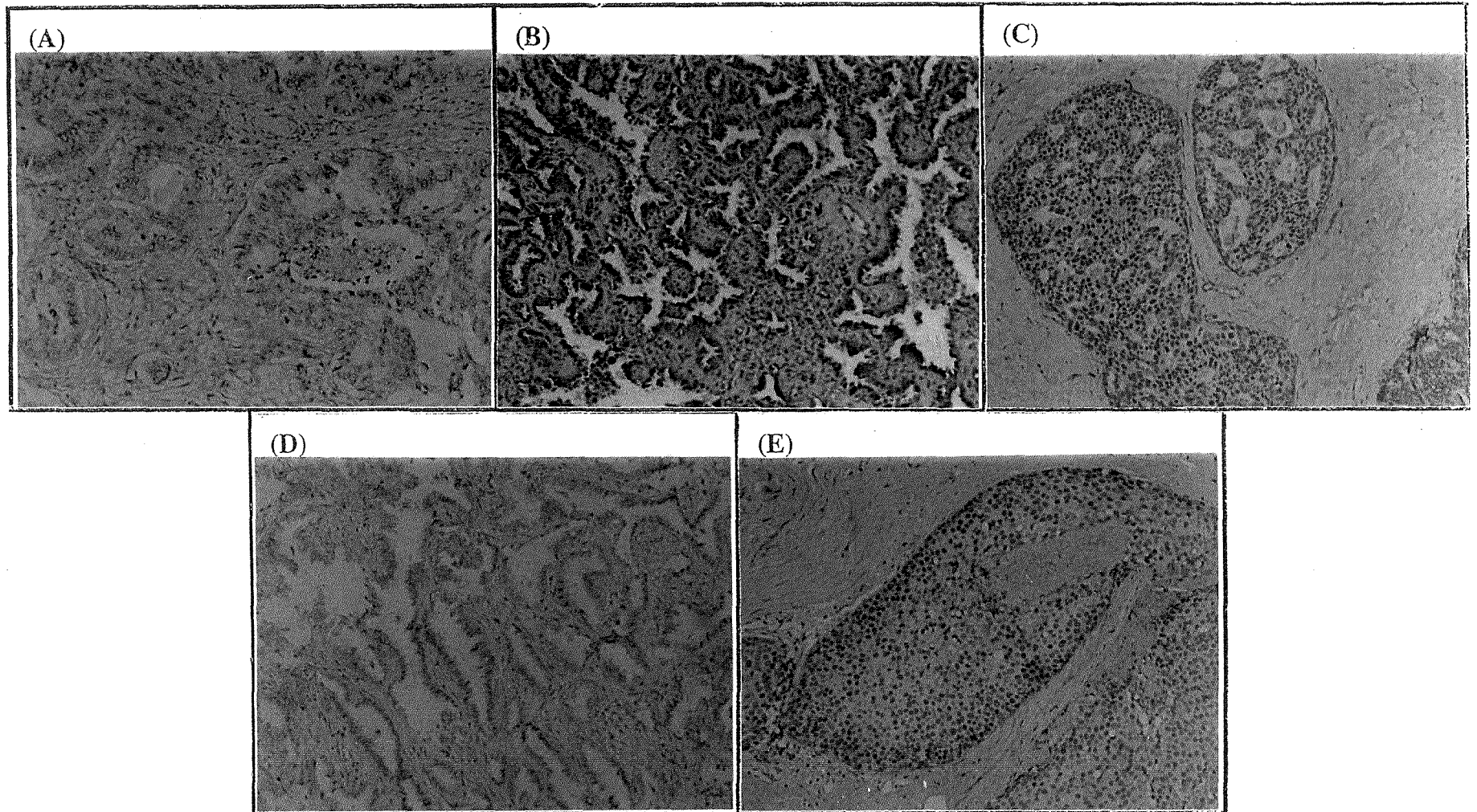


Fig 2. Immunohistochemical staining pattern of ER and PR in lung tumor specimen. (A) Negative response of PR in lung carcinoma, (B) Positive response of PR in tumor specimen, (C) Positive response of PR shown in nuclei and cytoplasm of tumor cells in breast cancer, (D) Negative response of ER in lung tumor specimen, (E) Positive response of ER shown in nuclei of tumor cells in breast cancer.

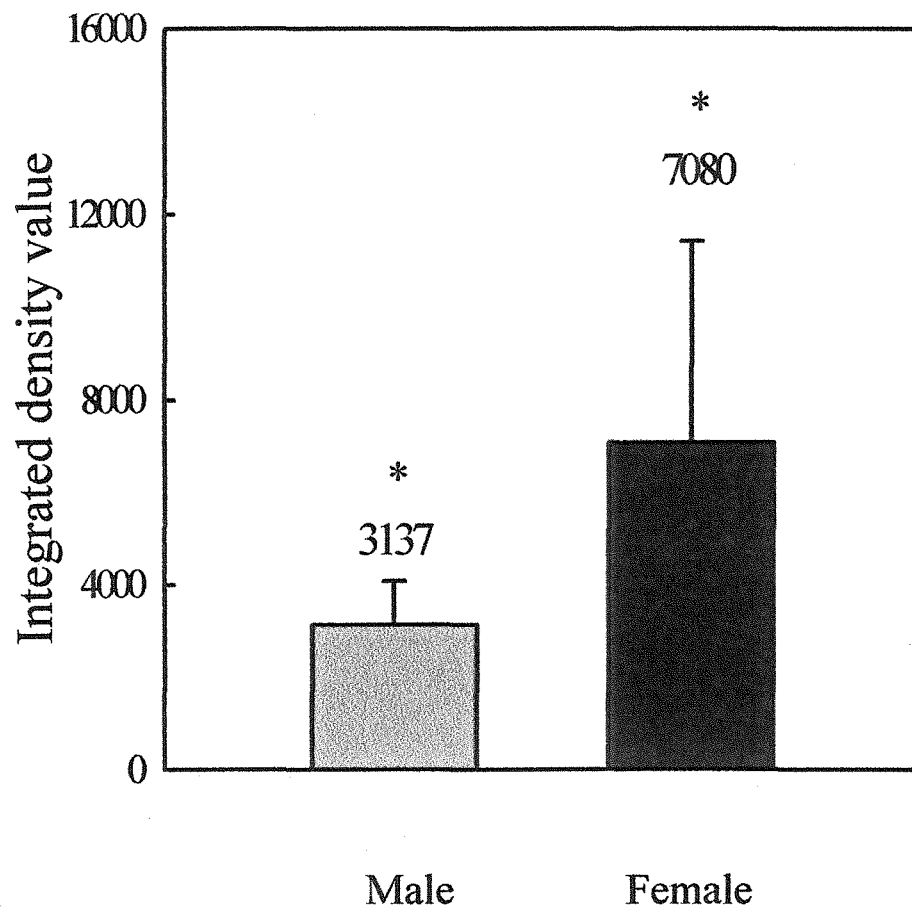
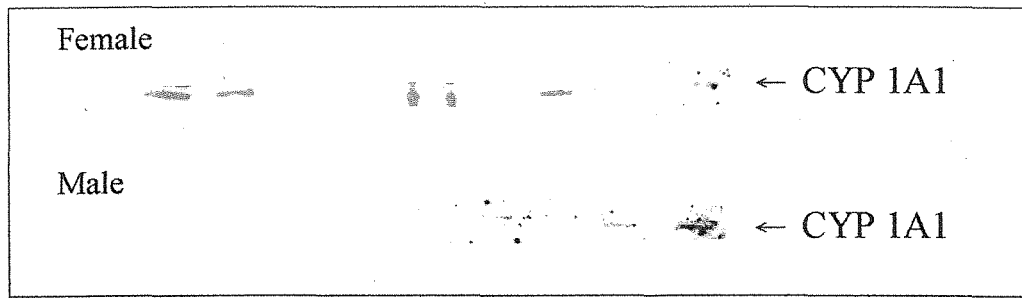


Fig 3. Comparison of the CYP 1A1 protein expression in non-tumor lung tissues between male and female lung cancer patients (Wilcoxon rank sums test,  $p < 0.05$ ).

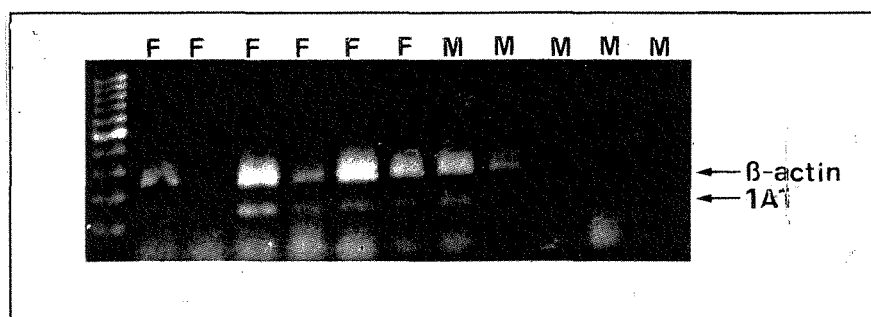


Fig 4. Comparison of the CYP 1A1 mRNA expression of non-tumor lung tissues between male and female lung cancer patients.

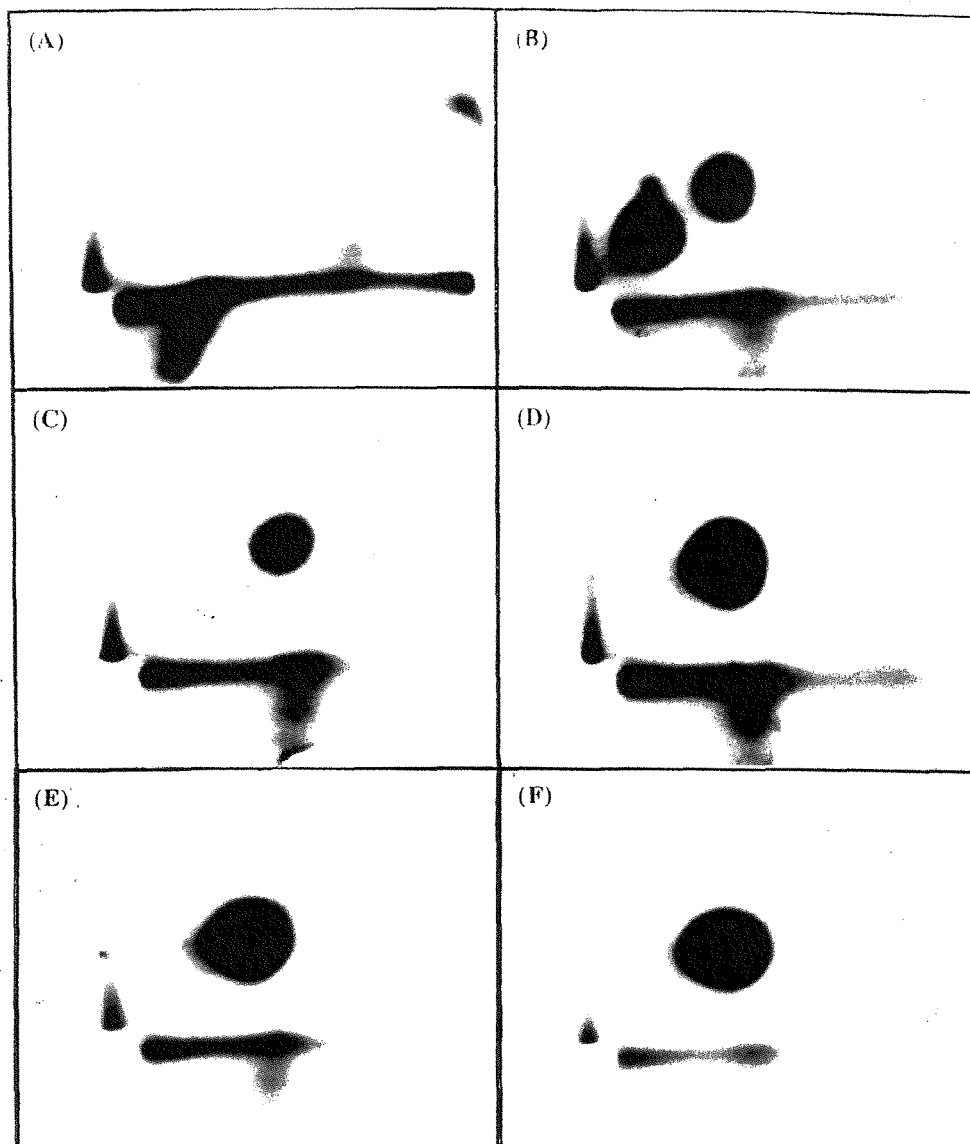


Fig 5.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells after the treatment of B[a]P (A) Solvent control-DMSO, (B) Calf-thymus DNA treated with  $50\mu\text{M}$  B[a]P as positive control. The CL-3 cells treated with (C)  $0.4\mu\text{M}$  B[a]P, (D)  $1.0\mu\text{M}$  B[a]P, (E)  $2.5\mu\text{M}$  B[a]P, (F)  $5\mu\text{M}$  B[a]P.

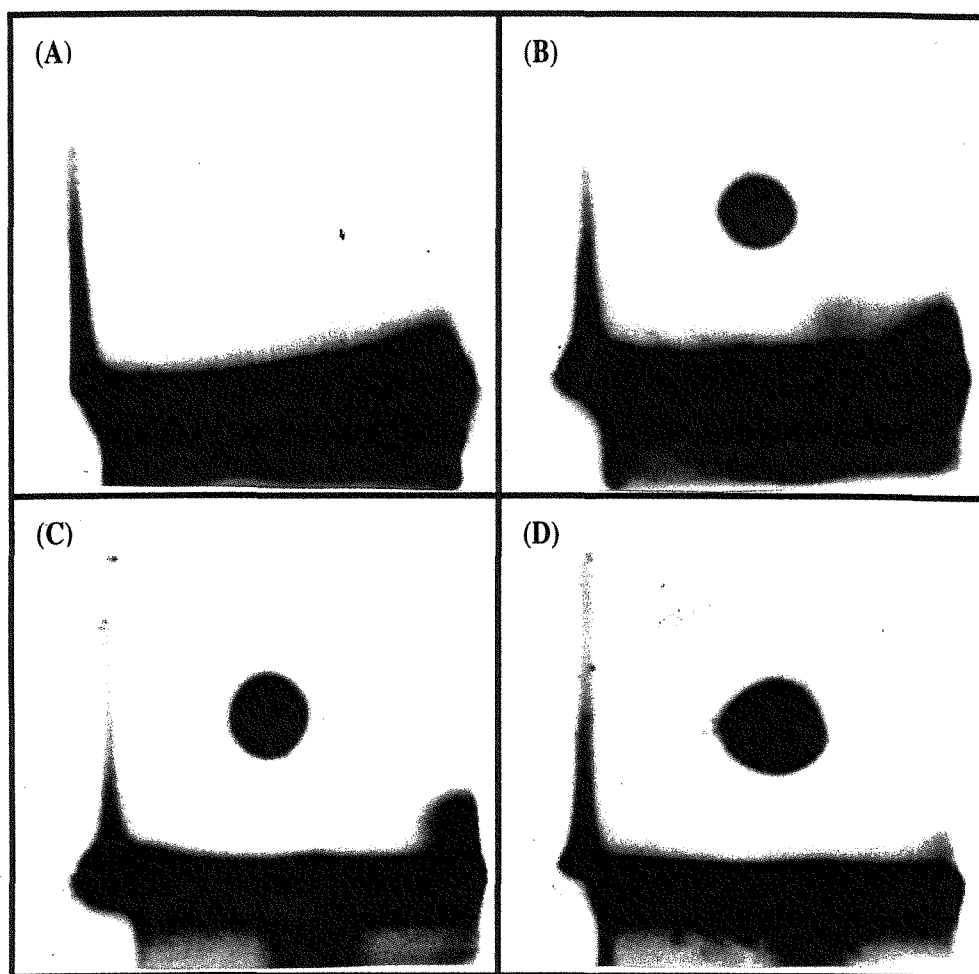


Fig 6.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells after the treatment of B[a]P ( $1.0\ \mu\text{M}$ ) with and without  $17\beta$ -estradiol. (A) Solvent control- DMSO, (B) B[a]P alone , (C) B[a]P+  $0.01\text{ng/ml}$   $17\beta$ -estradiol, (D) B[a]P+  $0.25\text{ng/ml}$   $17\beta$ -estradiol.

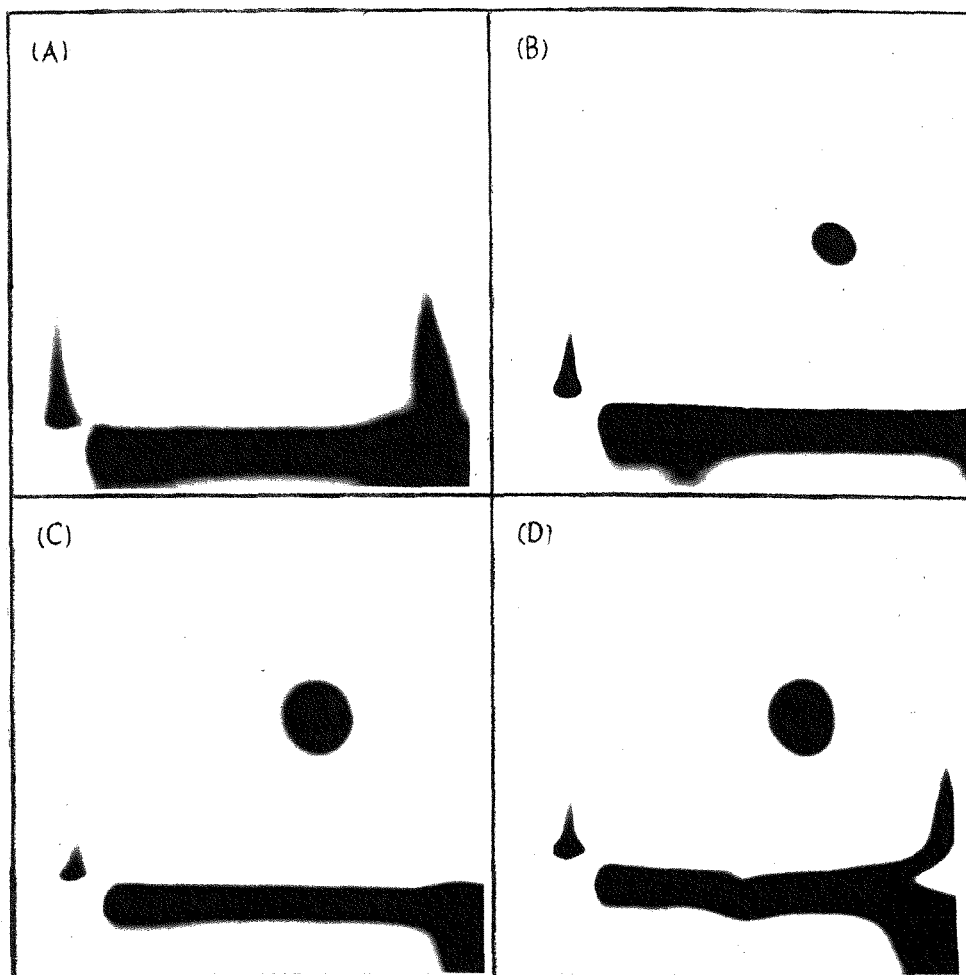


Fig 7.  $^{32}\text{P}$ -postlabeling autoradiograms of B[a]P-DNA adducts in CL-3 cells after the treatment of B[a]P ( $1.0\ \mu\text{M}$ ) with and without progesterone. (A) Solvent control- DMSO, (B) B[a]P alone , (C) B[a]P+  $1\ \text{ng/ml}$  progesterone, (D) B[a]P+  $20\ \text{ng/ml}$  progesterone.

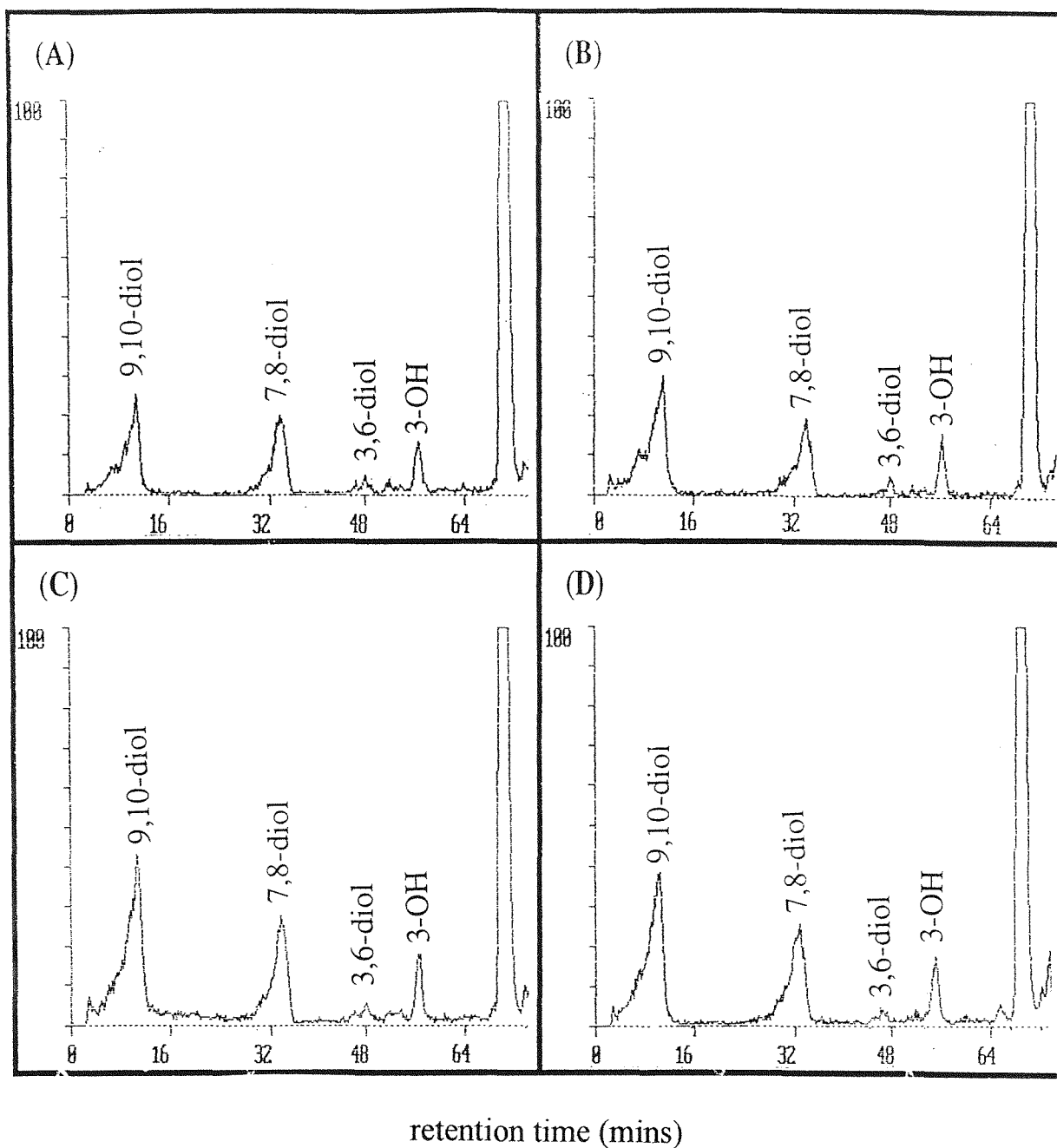


Fig 8. HPLC analysis of metabolites formed after incubation of [<sup>3</sup>H]-benzo[a]pyrene and 17 $\beta$ -estradiol in CL-3 lung adenocarcinoma cells (A) 1 $\mu$ M B[a]P, (B) 1 $\mu$ M B[a]P+ 0.01 ng/ml 17 $\beta$ -estradiol, (C) 1 $\mu$ M B[a]P+ 0.05 ng/ml 17 $\beta$ -estradiol, (D) 1 $\mu$ M B[a]P+ 0.25 ng/ml 17 $\beta$ -estradiol.



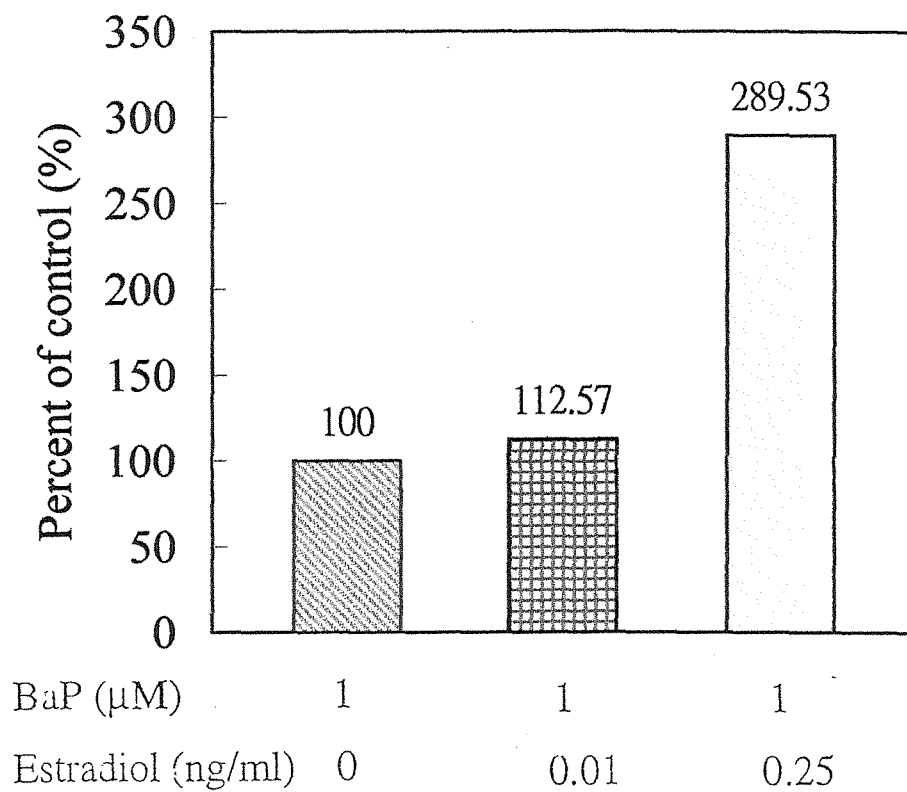


Fig 9. Effects of estradiol on the EROD activity of CL-3 cells treated by 1 $\mu\text{M}$  B[a]P (Wilcoxon rank sums test,  $P < 0.05$ ).

## 捌、英文摘要

Lung cancer is the leading cause of cancer death in Taiwan. Smoke is the most important risk factor of lung cancer. Less 4% of Taiwanese women are smokers, however high mortality rate of lung cancer was observed compared to other countries. Our previous data indicated that DNA adduct levels in nontumor tissues of female lung cancer patients were higher than those of male patients. We are interesting to study the possible cause(s) resulting high DNA adduct levels in female patients. In addition, some environmental pollutants, such as oil smoke, incense smoke and passive smoke may be associated with the incidence of female lung cancer. Moreover, the different hormone control was explained for different susceptibility to environmental pollutant and tobacco smokes among male and female patients. In the present study, we attempt to elucidate the role of estrogen and progesterone, and CYP1A1 gene expression on the high chemical susceptibility among female lung cancer patient.

In order to clarify the role of estrogen and progesterone on high DNA adducts of female lung cancer patients, the immunohistochemistry was first used to detect the expression of estrogen and progesterone receptor in lung tumor specimens of 27 lung cancer patients. The result showed that the expression percentage of progesterone receptor in female lung cancer patients (47%) was significant higher than that of male patients (17%) ( $P < 0.05$ ).

Moreover, female lung cancer patients possessed progesterone receptor expression seem to have a trend of high DNA adduct levels in their nontumor lung tissues. These results suggest that progesterone receptor expressed in lung tissues seem to associate the high chemical susceptibility in female lung cancer patient.

PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbon) are mainly airborne genotoxic compounds. CYP1A1 is well known to involve PAHs metabolic activation. To elucidate the role of CYP1A1 on the chemical susceptibility among male and female lung patients, the CYP1A1 protein expression in nontumor lung tissues from male and female lung cancer patients were analyzed by Western blot. The CYP1A1 protein expression in female patients was significantly higher than that of male patients. The result suggest that high induction of CYP1A1 protein expression by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollutants may be associated with high DNA adduct levels in female lung cancer patients.

To verify the role of estradiol and progesterone on the formation of DNA adduct, and the effects of estradiol on B[a]P metabolism and the activity of CYP1A1 linked-EROD in CL-3 human lung adenocarcinoma cells, <sup>32</sup>P-postlabeling and HPLC-radioactive detector were used. B[a]P-DNA adduct levels in CL-3 cells were elevated to 2.7 and 2.9 folds with the addition of estradiol (0.25 ng/ml) and progesterone (20 ng/ml) respectively. The amount of 3-OH, 7,8-diol, and 9,10-diol in CL-3 cells were increased by the addition

of estradiol. The increase of B[a]P metabolism by estradiol may be resulted by the induction of CYP1A1. Moreover, we also demonstrated that EROD activity in CL-3 cells was increased by the addition of estradiol.

In summary, high chemical susceptibility in female lung cancer patients observed from higher DNA adducts in lung tissues seem to be associated with the high expression of progesterone receptor, and CYP1A1 gene and its enzyme activity than male lung patients.