

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

農藥暴露與粒線體 DNA 傷害 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-011-
執行期間：97年08月01日至98年10月31日
執行單位：中山醫學大學公共衛生學系(所)

計畫主持人：翁瑞宏
共同主持人：胡瓊文
計畫參與人員：此計畫無其他參與人員

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 98 年 11 月 19 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

農藥暴露之果農其 OGG1 基因多形性相關於粒線體 DNA 傷害

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2314-B-040-011-

執行期間：2008 年 8 月 1 日至 2009 年 10 月 31 日

計畫主持人：翁瑞宏 教授

共同主持人：胡瓊文 副教授

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、

列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 公共衛生學系

中 華 民 國 98 年 11 月 19 日

摘要

農藥 (pesticide) 暴露已經在原先的流行病學中被觀察到是相關於若干的惡性腫瘤疾病，粒線體DNA (mitochondrial DNA [mtDNA]) 的氧化傷害也已經被推測在細胞死亡與致癌機制上扮演一重要的調節者。在粒線體中，含錳超氧化物歧解酶 (manganese superoxide dismutase [MnSOD]) 為對抗超氧自由基攻擊的第一道防線；OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) 蛋白則也是主要的DNA糖解酶，來修補粒線體DNA 8-oxoG受損部位。然而，對於具有不同人類MnSOD和OGG1基因變異者其在農藥所導致的粒線體基因毒性並未被探討。在本研究中，即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction [real time qPCR]) 被執行，來評估120名經歷農藥暴露的果農與106名未暴露的對照其個人周邊血液的粒線體DNA (ND1基因) 以及核DNA (β -actin基因) 的含量；藉由被定量出的ND1基因含量除以對應的 β -actin基因含量，計算出粒線體與核DNA之比值，來評估粒線體DNA傷害。問卷被執行以獲取人口學資料、抽菸習慣以及職業史。MnSOD和OGG1基因型則是以聚合酶鏈鎖反應為基礎的限制片段多形性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 分析加以判定。結果顯示經歷高或低農藥暴露的個人相較於對照，具有較高的粒線體DNA相對含量。有趣的是，在調整可能的干擾因子效應後，多變項迴歸模式顯示OGG1 Ser-Ser ($P = 0.03$) 基因型是顯著相關於增加的粒線體DNA相對含量。然而，並沒有顯著的相關於MnSOD基因型與增加的粒線體DNA傷害間被呈現。因此，我們的結果顯示具有易感受性OGG1基因型之個人，可能對於農藥所導致的粒線體DNA傷害具有增加的危險。

關鍵詞：農藥、MnSOD基因、OGG1基因、粒線體DNA傷害

Abstract

Pesticide exposure has been observed to be associated with various neoplastic diseases in previous epidemiological studies. Oxidative damage to mitochondrial DNA (mtDNA) has been also proposed to be an important mediator in cell death and carcinogenesis. In mitochondria, the manganese superoxide dismutase (MnSOD) is the first line of defense against superoxide radicals. The 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) is also the major DNA glycosylase for the repair of 8-oxoG lesions in the mitochondrial DNA. However, the mitochondrial genotoxicity of pesticides in people with various genetic variation of human MnSOD and OGG1 has not been investigated. In this study, the mtDNA (ND1 gene) and nuclear DNA (β -actin gene) in the peripheral blood of 120 fruit growers who experienced pesticide exposure and 106 unexposed controls was quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction (real time qPCR). To evaluate mitochondrial DNA damage, mitochondrial to nuclear DNA ratio was calculated by dividing the mtDNA quantity for ND1 gene by the corresponding β -actin quantity. Questionnaires were administered to obtain demographic data, and histories of cigarette-smoking habits, and occupation. The genotypes of MnSOD and OGG1 were identified by the PCR based restriction fragment length polymorphism (RFLP). The results showed that subjects experiencing high or low pesticide exposure had a greater mtDNA content (mtDNA damage) than did controls. Interestingly, after adjusting the effect of possible cofounders, the multiple regression model revealed that OGG1 Ser-Ser ($P = 0.03$) genotype was significantly associated with an increased relative content of mtDNA. However, no significant association between MnSOD genotype and mtDNA damage was revealed. Thus, results suggest that individuals with susceptible OGG1 genotype may experience an increased risk of mitochondrial DNA damage by pesticide exposure.

Key Words: Pesticide, MnSOD, OGG1, Mitochondrial DNA damage.

研究背景與研究動機

農藥 (pesticide) 是使用來控制農業上病蟲害的化學物，並且因為廣泛的使用，已經引起對於農藥潛在危害效應的評估之注意；而個體增加的基因毒性已經被瞭解是相對於癌症危險。在職業或環境中的農藥暴露多是混合多種農藥暴露的情形，而針對單一化合物評估其基因毒性的潛在性是無法來推估人群的確實暴露；因此，針對人群來進行其基因毒性之生物偵測，應足以評估個體暴露於多種混合化學物質所導致的基因傷害。

由於粒線體 (mitochondria) 在細胞能量的提供、內生性反應氧化物種 (reactive oxygen species [ROS]) 的產生以及細胞凋零 (apoptosis) 之機制上扮演一個重要的角色，所以粒線體功能缺損被建議與癌症生成具有密切的相關性。目前，粒線體 DNA 含量的變化已被考量為是粒線體基因結構損傷的生物標記；粒線體 DNA 拷貝數的增加被認為可能是因為回饋機制 (feedback mechanism) 的表現，以補償增加的粒線體氧化性傷害以及粒線體呼吸功能的改變⁽¹⁾。因此，暴露於農藥的個體可能具有粒線體 DNA 含量的明顯變化。

超氧化物歧解酶 (superoxide dismutase [SOD]) 是細胞防禦的第一線，可藉由清除自由基 (free radicals) 所造成的氧化傷害來保護細胞。在粒線體中，含錳超氧歧解酶 (manganese superoxide dismutase [MnSOD]) 催化超氧化自由基 (superoxide radicals) 的歧解 (dismutation)，而產生過氧化氫 (hydrogen peroxide [H₂O₂]) 與氧；而過氧化氫在體內通常可藉由與麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase [GPx]) 反應代謝⁽²⁾。人類 MnSOD 基因上的一個鹼基對的置換 (T→C)，被發現在氨基酸密碼子-9 位置從 valine 轉變成為 alaine⁽³⁾。如此氨基酸的改變可能影響酵素的細胞分派以及進入粒線體的 MnSOD 粒線體傳輸，使得 ROS 以及自由基的產生與移除間失去平衡，以致於氧化壓力 (oxidative stress) 的升高，進而導致粒線體 DNA 結構之損傷。因此，MnSOD 在氧化傷害及粒線體 DNA 變異間可能扮演著一個重要的角色。此外，DNA 修補能力可能在農藥相關的致癌過程中扮演一重要角色。當 DNA 傷害的移除與修補功能在保護基因體的完整性中扮演一項關鍵的角色時；而個人具有 DNA 修補缺陷就可能是具有 DNA 傷害增加及癌症發生之較高的危險。在人類細胞的粒線體 DNA 中，8-oxoguanine (8-oxoG) 為最普遍可被觀察到的氧化產物，並且主要經由 DNA 鹼基切除修補路徑 (base excision repair [BER]) 來修補粒線體 DNA 8-oxoG 之損傷的鹼基部位⁽⁴⁾。而人類 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) 酵素本身同時具有糖解酶 (glycosylase) 以及 apurinic/apyridinic endonuclease1 (APE1) 內切酶的功能，是以 DNA 鹼基切除修補的方式切除 8-oxoG，然後經由 DNA 聚合酶β和 DNA 接合酶將鳥糞嘌呤 (guanine) 黏合至 DNA 序列中^(5,6)。OGG1 基因在密碼子 1245 的對偶基因 C→T 多形性所造成的 Ser→Cys 氨基酸變異已經被報告⁽⁷⁾。特定多形性的存在似乎相對於增加或減少的癌症易感受性，這是根據癌症類型和 DNA 傷害物質之環境暴露程度而定。

前言

56 類農藥已經被國際癌症研究中心 (International Agency for Research on Cancer [IARC]) 歸類為對實驗動物是具有致癌性⁽⁸⁾。而人群觀察研究也被報告指出，苯氧酸類 (phenoxy acid) 殺草劑、2,4,5-三氯酚氧乙酸 (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid [2,4,5-T])、靈丹 (lindane)、甲氧氯 (methoxychlor)、毒殺芬 (toxaphene) 以及若干有機磷也與人類的癌症發生有關。統合分析 (meta-analyses) 的結果顯示，農藥暴露的農民對於特定癌症的發生是較具危險的，如白血病 (leukaemia)⁽⁹⁻¹¹⁾ 以及多發性骨髓瘤 (multiple myeloma)⁽¹²⁾。然而，對於農藥暴露的農民之癌症發生危險的流行病學證據卻是分歧的；而對於大部分其他部位之癌症發生危險，相較於其他族群，農民反而被發現具有較低的發生危險，這可能是健康工人效應 (healthy worker effect) 所導致。

大多數的農藥已經被廣泛地以各式的致突變性實驗來加以測試⁽¹³⁻¹⁵⁾，並且農藥也被視為可能的化學致癌物。然而在多數的實驗中，觀察到足以產生最小效應的劑量普遍是相當大的。在職業或環境中的農藥暴露多是混合多種農藥暴露的情形，而針對單一化合物評估其基因毒性的潛在性是無法來推估人群的確實暴露；因此，針對人群來進行其基因毒性生物偵測，應足以評估個體暴露於多種混合化學物質所導致的基因傷害。部份細胞遺傳學分析已經被使用來評估職業暴露族群因農藥暴露所導致的潛在基因毒性；然而，關於農藥暴露族群其基因毒性效應的報告，是有正向⁽¹⁶⁻¹⁸⁾，同樣地也有負向的發現^(19,20)。

人類的基因體 (genome)，可分為細胞核基因體 (nuclear genome) 及粒線體基因體 (mitochondrial genome) 兩部分⁽²¹⁾。細胞核基因體是位於細胞核內的 DNA，其長度為 3,200 百萬鹼基，帶有 30,000 至 35,000 個基因。細胞核基因體僅 1.5% 為具有轉錄功能的 DNA (coding DNA)，而反覆性 DNA (repetitive DNA) 則高達 50%。其遺傳方式基本上是遵循孟德爾模式，不過 Y 染色體則是遵循父系遺傳 (paternal inheritance)。

粒線體存在於真核細胞中，為一具雙層膜構造並可半自給自足的胞器，且本身間質部位具有一套獨立的基因系統^(21, 22)。在哺乳類動物和人類之粒線體與粒線體 DNA 都是由卵子所提供，屬於母系遺傳 (maternal inheritance) 方式。粒線體 DNA 在細胞中為多倍體 (polyploidy)，細胞行有絲分裂時，細胞內的粒線體及其 DNA 會隨機地分散到子代細胞中，再經由粒線體生合成機制維持細胞中一定的粒線體及粒線體 DNA 含量。

每個人類細胞約含有數百至上千個粒線體，每一粒線體帶有 1 至 10 個核體 (nucleoid)，約 70% 的粒線體為多核的 (multinucleated) 粒線體，平均有 3.2 個核體⁽²³⁾；而每一個核體平均含有 1.4 組的粒線體 DNA 拷貝數 (mtDNA copy number)，所以每一粒線體平均的 DNA 拷貝數則為 4.6 組。雖然粒線體在不同類型的細胞有不同的 DNA 拷貝數，其範圍為 1 至 15 組，但是大部分的粒線體帶有 2 至 6 組，基本上同類型的細胞都維持一定的拷貝數。

人類粒線體基因體在 1981 年已被完整地定序⁽²²⁾；粒線體 DNA 為雙股環狀結構，其序列由 16,569 個鹼基對所組成，含有 37 組基因序列，包括 13 個組成電子傳遞鏈蛋白結構的次單元勝肽基因，以及與粒線體合成蛋白相關的 22 個 tRNA 和 2 個 rRNA。粒線體基因序列為連續性排列，其基因之間並無內顯子 (intron) 的非轉譯區 (non-coding region)。但是，粒線體 DNA 中有一段是不具有轉錄基因序列的區域為粒線體 DNA 控制區 (displacement region)，又稱 D-loop 區，其帶有粒線體 DNA 複製的起始點以及轉錄的促進子的位置，負責粒線體 DNA 的複製及轉錄。

粒線體在體內主要是藉由其內膜上的電子傳遞鏈 (electron transport chain) 行氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 反應來產生能量 ATP (adenosine triphosphate)，並且提供 90% 細胞正常運作所需的能量⁽²³⁾。電子傳遞鏈主要是由五個蛋白複合體所組成，分別是呼吸酵素複合體 I (complex I: NADH-ubiquinone oxidoreductase)、呼吸酵素複合體 II (complex II: succinate-ubiquinone oxidoreductase)、呼吸酵素複合體 III (complex III: ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase)、呼吸酵素複合體 IV (complex IV: cytochrome c oxidase) 和呼吸酵素複合體 V (complex V: ATP synthase)；這些呼吸酵素複合體是由 74 個細胞核基因以及 13 個粒線體基因轉錄出的蛋白所組成。此外，尚有維持正常電子傳遞鏈三個相當重要的複合體，包括 dihydroorotate: CoQ-oxidoreductase、electron transfer flavoprotein: CoQ-oxidoreductase 及 adenine nucleotide translocator。粒線體主要是藉由氧化檸檬酸循環 (tricarboxylic acid cycle [TCA cycle]) 產生的 NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) 及 FADH₂ (flavin adenine dinucleotide) 過程使粒線體內外形成氫離子的電化學梯度差 (electrochemical gradient)，進而使氫離子回流並且促使呼吸酵素複合體 V (ATP synthase) 把 ADP 分子磷酸轉化成 ATP^(24, 25)。

粒線體被認為是內生性反應性氧化物種 (ROS) 的主要來源；在能量的合成過程中，有些電子會從電子傳遞鏈的蛋白複合體散溢 (主要是複合體 I 和 III)，亦即電子流分歧的發生，並且形成反應性氧化物種。超氧陰離子 (superoxide anion [O₂⁻]) 自電子傳遞鏈散溢後，自然地或者透過含錳超氧歧解酶 (MnSOD) 作用而產生過氧化氫 (H₂O₂)。而過氧化氫在體內通常會藉由與麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 反應代謝。但是，倘若麩胱甘硫 (glutathione) 耗盡或者是過氧化氫大量產生，則過氧化氫會與鐵離子 (Fe⁺) 反應產生氫氧根自由基 (hydroxyl radical [OH[·]])。進而，具有高度反應性的氫氧根離子則會傷害粒線體內的大分子，如脂質、蛋白質以及 DNA⁽²⁶⁾。

細胞凋零 (apoptosis) 為抑制癌細胞生成的重要機制，避免細胞不正常的增生而使得癌症生成。粒線體中含有許多活化細胞凋零的蛋白質及化學分子，因此，粒線體在細胞凋零的機制中也扮演一重要的調節角色。部分由細胞核基因轉錄的前-凋零蛋白 (pro-apoptotic proteins)，如細胞色素 c (cytochrome c)、凋零促進因子 (apoptosis inducing factor [AIF]) 以及核內酶 G (endonuclease G) 等平時都位於粒線體內；然而，當細胞接受細胞凋零訊息後，粒線體會失去膜電位，內膜便會釋出這些蛋白因子引發一系列的生化反應，而使得凋零訊息的連鎖反應開始運作，進而引發細胞凋零^(27, 28)。相反地，粒線體也存有抗細胞

凋零的蛋白質，Bcl-2 蛋白位於粒線體及內質網膜上，能抑制內膜釋出細胞色素 c 及其他蛋白質來抑制細胞凋零⁽²⁹⁾。

當粒線體內產生過多的內生性 ROS，或者是由外來物質所產生的 ROS 無法被有效地去除時，則會對細胞產生氧化壓力，進而傷害粒線體的大分子，如脂質、蛋白質、粒線體 DNA 等⁽²⁶⁾。因為人類細胞中粒線體 DNA 缺乏組織蛋白的保護且欠缺高效率的 DNA 修復機制，因此相較於細胞核 DNA 是較容易遭受氧化性傷害且持續存在著⁽³⁰⁾。流行病學研究已經報告指出，粒線體 DNA 傷害對於特定疾病的發生是較具危險的。Wallace 等人⁽³¹⁾觀察到，罹患雷伯氏遺傳性視神經病變 (Leber's hereditary optic neuropathy [LHON]) 的患者具有粒線體 DNA 突變的現象。Kearns Sayre 氏症候群 (Kearns Sayre syndrome) 及慢性進展眼圈周圍肌肉麻痺 (chronic progressive external ophthalmoplegia [CPEO]) 則是因為粒線體 DNA 受損，在複製時造成配對錯誤 (mispairing) 所導致^(32,33)。在針對口腔癌的研究也發現，因嚼食檳榔所產生的氧化壓力可導致粒線體 DNA 呈現不穩定的現象，如粒線體 DNA 片段遺失 (deletion)⁽³⁴⁾、框構轉移突變 (frameshift mutation)、以及錯義突變 (missense mutation)⁽³⁵⁾。此外，粒線體 DNA 突變也被系統地探討與癌症發生之相關⁽³⁶⁾，在乳癌⁽³⁷⁾、卵巢癌⁽³⁸⁾、大腸直腸癌⁽³⁹⁾、胃癌⁽⁴⁰⁾、肝細胞癌⁽⁴¹⁾、食道癌⁽⁴²⁾、前列腺癌⁽⁴³⁾、神經膠瘤⁽⁴⁴⁾、以及甲狀腺癌⁽⁴⁵⁾等原發性癌症研究中，都觀察到在癌細胞組織相對於周邊正常細胞組織有較高頻率的粒線體 DNA 變異情形。而在急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia) 細胞相較於正常細胞，也發現到具有較高頻率的粒線體 DNA 結構變異；並且在急性淋巴性白血病 (acute lymphoid leukemia) 以及骨髓發育不全症候群 (myelodysplasia) 的病患也發現到有較高頻率的粒線體 DNA 突變⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾。由於粒線體在細胞能量的提供、內生性反應氧化物種的產生以及細胞凋零之機制上扮演一個重要的角色，所以粒線體功能缺損被建議與癌症生成具有密切的相關性。

進一步地，研究也發現到在粒線體疾病如雷伯氏遺傳性視神經病變 (LHON) 的患者⁽⁴⁹⁾、老化的肌肉組織⁽⁵⁰⁾以及子宮內膜癌細胞⁽⁵¹⁾中有粒線體不正常增生的情形。在老年人的肺部組織中也被觀察到具有粒線體 DNA 拷貝數增加的狀況，亦即粒線體 DNA 含量增加⁽¹⁾。Lee 等人⁽¹⁾認為粒線體 DNA 拷貝數的增加可能是由於迴饋機制 (feedback mechanism) 的表現，以補償因老化所增加的粒線體氧化性傷害以及粒線體呼吸功能的改變。隨後，Lee 等人⁽⁵²⁾將人類肺部纖維母細胞暴露於強氧化劑 H₂O₂，發現到細胞被停留於 G₀ 和 G₁ 的階段，但是粒線體的質量以及粒線體 DNA 含量有明顯增加的情況；因此，粒線體質量及其 DNA 含量增加被建議為人類細胞接觸到毒性物質所產生之氧化傷害的一項分子證據。

進一步地，DNA 傷害因子如抽菸也被觀察到與粒線體 DNA 含量的變化具有相關性^(1,53)。具抽菸習慣者相較於無抽菸習慣者的粒線體 DNA 含量具有顯著增加的情形；並且，粒線體 DNA 含量與抽菸包年呈現顯著的正向劑量關係。特別的是，戒菸數十年後之戒菸者，其抽菸相關的粒線體 DNA 變異仍然長期存在著⁽⁵³⁾；此結果建議著，抽菸可能會造成長期的粒線體基因毒性之傷害。因為抽菸於短期間內所傷害之細胞和粒線體的膜及蛋白組成，可經由重新合成的分子替代而停止損害產生；因此，粒線體 DNA 的增加似乎是因為菸草暴露的慢性傷害所引起的長期回饋效應。然而，相歧異的結果也被觀察到，在大於六十歲的老年族群中具較高菸草暴露的個體，其肺部組織粒線體 DNA 含量顯著少於具較低菸草暴露的個體⁽¹⁾。

而在人類腎細胞癌⁽⁵⁴⁾、以及肝細胞癌⁽⁵⁵⁾等原發性癌症研究中，也觀察到粒線體 DNA 含量減少的情形。Liu 等人⁽⁵⁶⁾發現，正常人的白血球細胞內粒線體 DNA 的含量會隨著年紀的增加而上升，但超過 55 歲以後便開始下降。此外，在具有 4977 bp 斷損突變之粒線體 DNA 的融合細胞中也觀察到，粒線體 DNA 含量會隨著斷損突變的百分比增高，有先上升再下降的情形⁽⁵⁷⁾。

粒線體呼吸功能隨著老化而缺損，組織細胞則可藉由誘發粒線體的增生，或者增加氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation [OXPHOS]) 基因家族的表現，來對於減少之 ATP 合成進行補償⁽¹⁾。反應性氧化物種 (ROS) 與自由基 (free radicals) 已被證實可能扮演二級訊息傳遞者 (secondary messengers) 的角色，以活化如 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 以及 activator protein-1 (AP-1) 等轉錄因子^(58,59)。因此，氧化壓力及氧化性 DNA 傷害可能促進粒線體 DNA 複製以及轉錄之作用。進一步地，先前的研究也顯示當人類細胞具有電子傳遞鏈的損傷時，可促進核內與粒線體基因的表現⁽⁶⁰⁾。然而，氧化壓力的升高可使粒線體 DNA 傷害增加，以致於 DNA 模版不完整，DNA 複製效果也因此較差因而造成粒線體 DNA 含量下降⁽⁶¹⁻⁶³⁾。無論是粒線體 DNA 含量的增加或減少，粒線體 DNA 含量的變化已被考量是粒線體基因結構損傷

的生物標記。

超氧化物歧解酶 (SOD) 是細胞防禦的第一線，可藉由清除自由基 (free radicals) 所造成的氧化傷害來保護細胞。超氧化物歧解酶已知具有三種型態：分別為細胞質含銅/鋅超氧化物歧解酶 (cytosolic copper/zinc SOD)、細胞外含銅/鋅超氧化物歧解酶 (extracellular copper/zinc SOD) 和粒線體含錳超氧化物歧解酶 (mitochondrial manganese superoxide dismutase; superoxide dismutase 2 [SOD2])。在細胞中，粒線體是反應性氧化產物的主要來源，可經由氧化磷酸化路徑而產生其能量的毒性副產物。MnSOD 在細胞質中被合成並且進行後轉錄修飾以運送至粒線體內^(3, 64)。在粒線體中，MnSOD 催化超氧化自由基的歧解，而產生過氧化氫與氧；而過氧化氫在體內通常可藉由與麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 反應代謝⁽²⁾。Lu 等人⁽⁶⁵⁾觀察人類皮膚組織，發現氧化壓力指標 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 以及脂質氧化產物-丙二醛 (malondialdehyde [MDA]) 會隨著年齡增加而增加，並且同時發現人類皮膚組織帶有 4977 bp 缺損的粒線體 DNA 比例也會隨著年齡增加而增加；有趣的是，在老化皮膚組織中也觀察到具有 MnSOD 蛋白減少的現象。MnSOD 蛋白的減少可能使得 ROS 以及自由基的產生與移除間失去平衡，以致於氧化壓力的升高，進而導致粒線體 DNA 結構之損傷。因此，MnSOD 在氧化傷害及粒線體 DNA 變異間可能扮演著一個重要的角色。

人類 MnSOD 基因是位於染色體 6q25 的位置⁽⁶⁶⁾，並且 MnSOD 的基因變異已經被辨識出⁽³⁾；在粒線體標的序列 (mitochondrial targeting sequence) 上的一個鹼基對的置換 (T→C)，被發現可改變訊息勝肽在氨基酸密碼子-9 位置從 valine 成為 alanine。如此氨基酸的改變也改變了蛋白質的二級構造，從 α 螺旋構造成為 β -摺頁結構⁽³⁾，並且可能影響酵素的細胞分派以及進入粒線體的 MnSOD 粒線體傳輸。MnSOD 的無效標的可能離開粒線體，而使得他們沒有足夠的防禦去對抗超氧化自由基。台灣人之 MnSOD 多形性其 Ala 對偶基因頻率範圍介於 13.9-30.0%⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾，而非裔美國人 Ala 對偶基因頻率為 41.4%，美國白人則是 51.5%⁽⁷⁰⁾。MnSOD Ala 對偶基因已被觀察到可能相關於帕金森氏症 (Parkinson's disease)⁽⁶⁸⁾、肺癌⁽⁶⁹⁾、乳癌^(70, 71)、結腸直腸癌⁽⁷²⁾之增加發生危險。因為 MnSOD 是反應性氧化產物 (ROS) 的一個主要清除者，我們因此假設 MnSOD Ala 對偶基因因為其減少氧化壓力的能力已經改變，而可能是相關於粒線體 DNA 變異的危險。

DNA 修補能力可能在農藥相關的致癌過程中扮演一重要角色。當 DNA 傷害的移除與修補功能在保護基因體的完整性中扮演一項關鍵的角色時；而個人具有 DNA 修補缺陷就可能呈現 DNA 傷害增加及癌症發生之較高的危險。細胞核 DNA 傷害的修補路徑已經被廣泛地觀察⁽⁷³⁻⁷⁵⁾，其路徑可分為 DNA 鹼基切除修補 (BER)、核酸切除修補 (nucleotide excision repair [NER])、錯配修補 (mismatch repair [MMR])、DNA 重組修補 (recombination repair)、DNA 複製後修補 (postreplication repair)、以及直接反轉修復 (direct reversal)。

然而，粒線體 DNA 的修復機制則尚未有完整明確地觀察，而透過 DNA 鹼基切除來進行 DNA 傷害修補是目前被提出的較可能之機制⁽⁴⁾。受損的鹼基可被特定的糖解酶所辨識並移除，然後產生一個 5' 磷酸雙脂鍵被 apurinic/apyridinic endonuclease 1 (APE1) 內切酶所切除的缺鹼基位 (abasic sites)；隨後，DNA 聚合酶 β 添加 1 單位的核苷酸至被切除的缺鹼基位之 3'-OH 端，並且切除掉無鹼基的糖磷酸根。最後，此可接合的缺口被 DNA 接合酶 III α (DNA ligase III α) 所封補起來。

在人類細胞的粒線體 DNA 中，8-oxoguanine (8-oxoG) 為最普遍可被觀察到的氧化產物。來自環境中的氧化壓力，如離子輻射線、化學毒性物質的暴露 (包括農藥暴露)、甚至在人體內正常細胞之代謝，都可能產生 8-oxoG。在粒線體中，主要是經由 DNA 鹼基切除修補路徑來修補粒線體 DNA 8-oxoG 之損傷的鹼基部位⁽⁴⁾；倘若承受到大量的氧化壓力而導致之傷害並且來不及修補，8-oxoG 就可能容易地造成 DNA G:C 配對的轉位發生，而變成 A:T 的點突變⁽⁷⁶⁾。

8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) 為一個 38-40 千道耳吞 (kDa) 的蛋白質，其功能與 FPG 酵素類似^(5, 6)。OGG1 本身同時具有糖解酶以及 APE1 內切酶的功能，主要是以 DNA 鹼基切除修補的方式切除 8-oxoG，然後經由 DNA 聚合酶 β 和 DNA 接合酶將鳥糞嘌呤 (guanine) 黏合至 DNA 序列中。此酵素在細胞核以及粒線體中都被觀察到，並且在人體具有兩種不同構型的蛋白，分別為 α -OGG1 和 β -OGG1。人類 OGG1 基因包含了八個外顯子 (exon)， α -OGG1 mRNA 轉錄外顯子第 1 至 7，而 β -OGG1 mRNA 則是轉錄外顯子第 1 至 6 以及 8，其中 α -OGG1 蛋白通常都被送往細胞核，而 β -OGG1 則被送至

粒線體。但是，Hashiguchi 等人⁽⁷⁷⁾ 的研究發現到 β -OGG1 是不具有糖解酶的功用，而在粒線體中也可以觀察到 α -OGG1 蛋白的存在；並且認為在人類粒線體 DNA 傷害的修補上，是由 α -OGG1 蛋白扮演 8-oxoG DNA 糖解酶的功能。

OGG1 基因已經在人類染色體 3p25-p26 位置被辨識，其在密碼子 1245 的對偶基因 C→G 多形性所造成的 Ser→Cys 氨基酸變異已經被報告⁽⁷⁾。華人之 OGG1 多形性，其 Ser 對偶基因頻率範圍介於 35.9-43.0% 之間⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾，而日本人 Ser 對偶基因頻率為 59.1%⁽⁸¹⁾，高加索人則是 83.9%⁽⁸²⁾。一項對於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 突變株所進行的功能性互補活性試驗 (functional complementation activity assay) 發現，326Ser 基因型表現的蛋白質其對 8-oxoG 傷害之修復能力為 326Cys 的七倍之多⁽⁸³⁾。特定多形性的存在似乎相關於增加或減少的癌症易感受性，這是根據癌症類型和 DNA 傷害物質之環境暴露程度而定。分子流行病學研究也已經探討人類 OGG1 基因多形性與改變癌症危險間的可能相關。Elahi 等人⁽⁸²⁾ 分析 169 名罹患口咽癌 (orolaryngeal cancer) 的高加索人以及 338 名健康對照，結果觀察到攜帶 Ser326Cys 和 Cys326Cys 基因型的個體相較於攜帶 Ser326Ser 基因型的個體有較高的口咽癌發生危險性。Xing 等人⁽⁸⁴⁾ 探討 196 名食道癌的病患以及 201 名健康對照，在調整年紀、性別與抽菸效應後，發現攜帶 Cys326Cys 基因型的個體具有較高的食道癌發生危險。然而，在攝護腺癌研究中則觀察到攜帶 Ser 對偶基因的個體有較高的攝護腺癌發生危險⁽⁸⁵⁾；Wikman 等人⁽⁸⁶⁾ 也發現，肺癌病人相較於健康對照具有較高比例之 Ser326Ser 基因型分佈。

因此，農藥暴露的個人具有易感受性抗氧化基因與 DNA 修補基因，可能對於其粒線體 DNA 傷害具有修飾作用。我們設計一個以族群為基礎的斷代研究 (cross-sectional study)，來探討抗氧化基因 MnSOD 和 DNA 修補基因 OGG1 多形性與農藥暴露的果農之粒線體 DNA 傷害的相關。我們預期結果是暴露於農藥的農民較無暴露於農藥的對照，可能具有較高的粒線體 DNA 傷害程度；具有易感受性 MnSOD 基因型的農藥暴露者較未攜帶易感受性 MnSOD 基因型者，可能呈現粒線體 DNA 傷害的增加危險；具有易感受性 OGG1 基因型的農藥暴露者較未攜帶易感受性 OGG1 基因型者，可能呈現粒線體 DNA 傷害的增加危險。

材料與方法

研究族群

在現今的研究中，總計有 120 名農藥暴露之果農與 106 名未暴露的對照被納入。我們藉由選擇與農藥暴露對象之相同種族與地理區域的對照對象，嘗試來減少一些可能來自種族與生活方式的偏差。對照之職業包括家庭主婦、教師、銷售員、非農業之勞工、技術人員、小本生意經營者以及其他專業人員。在這些對象中，並沒有人接受過放射線治療，他們也沒有服用任何藥物。我們提供所有參與者書面的研究內容敘述，對於無法閱讀者則由研究人員口述，而所有參與者的同意書也都被獲得。研究對象的個人特徵資料，是在每個研究對象提供其同意書後經由面對面的問卷訪視所收集。結構式問卷所涵蓋的問題包括：人口學特質、生活型態如抽菸及飲酒習慣、以及詳細工作史與疾病史。研究對象的抽菸史包括每天抽菸支數及抽菸年數；累積抽菸量是以抽菸包年計算，亦即每天的包數乘以抽菸的年數。大部分的台灣農民已經對於飲酒所增加之肝臟傷害危險具有認知，並且對於飲酒可增加農藥中毒具有良好的理解。一般而言，在噴灑農藥期間飲酒是不允許的行為；我們考慮一旦暴露農藥的個體在此情況下被納入我們的研究中，其飲酒之盛行率將較對照為低。因此，具有飲酒行為的研究對象在資料分析中被排除。

農藥暴露評估

在現今的研究中，過去農藥使用的資訊包括名稱、數量、農藥使用面積、每季農藥使用次數、農藥暴露年數以及個人的防護設施，皆透過面對面的問卷訪視所獲得。果園的平均面積為 1.28 公頃 (範圍從 0.06-4.85 公頃)，果農在健康檢查前六個月期間所使用的農藥成分將近有 40 種不同的化合物組成，包括有機磷、氨基甲酸鹽、除蟲菊殺蟲劑、殺真菌劑、以及生長調節劑，然而有機氯是不被使用的。每位暴露者每個月平均噴灑農藥三次，並且每月平均累積噴灑時間大約為 7 小時 (範圍 2-28 小時/月)。遺憾地，由於缺乏環境偵測的數據，對於我們研究對象的農藥暴露劑量是無法被計算；我們因此根據 Scarpato 等人⁽⁸⁸⁾ 原先所建議的以下標準加以修飾，將果農區分成高或低農藥暴露：(1) 對於每位噴灑農藥的研究對象，其工作噴灑農藥的總公頃數是藉由平均每年農藥使用次數 × 噴灑面積公頃，(2) 以及藉由計算 (1)

所得的數值分佈之中位數，若果農的暴露數值低或高於中位數，則分別被歸類為低或高暴露組，(3) 研究對象沒有直接處置農藥者 (例如修剪或採摘果實) 則被考慮為低暴露組。

粒線體 DNA 含量評估

所有研究對象的靜脈血液被收集在含有肝素的採血管中，然後進一步地從中分離出血漿、buffy coat 以及紅血球；這些樣本必須在當天處理並且儲存在 -70°C 下。粒線體 DNA 含量的評估，是根據 Liu 等人⁽⁵⁶⁾於 2003 年所描述的方法加以修飾執行。即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction [real time qPCR]) 被執行，來評估個人周邊血液的粒線體 DNA (ND1 基因) 以及核 DNA (β -actin 基因) 的含量；藉由被定量出的 ND1 基因含量除以對應的 β -actin 基因含量，計算出粒線體與核 DNA 之比值，以評估粒線體 DNA 傷害。用以增幅 ND1 基因的引發子序列為 forward primer 5'-GGA GTA ATC CAG GTC GGT-3' 和 reverse primer 5'-TGG GTA CAA TGA GGA GTA GG-3'，增幅的片段長度為 264 bp；用以增幅 β -actin 基因的引發子序列為 forward primer 5'-TGG CAT TGC CGA CAG GAT-3' 和 reverse primer 5'-GCT CAG GAG GAG CAA TGA TCT-3'，增幅的片段長度為 195 bp。20 ng 的 DNA 模版被加入至包含有 10 μM 的引發子、0.6 μL AmpliTaq gold DNA 聚合酶、以及 12 μL 的 SYBR Green PCR Master Mix 試劑組 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA；包含 400 μM 之去氧核苷三磷酸 [dNTPs]、25 μM MgCl_2 和 10 \times SYBR Green 反應緩衝液)，最終體積以蒸餾水調成 25 μL 。使用 ABI Prism 7700 即時定量 PCR 機器 (Applied Biosystems) 執行 SYBR Green 偵測模式來增幅，程式組成依序為：在 95°C 下先前變性 780 秒後，於 95°C 下變性 (denaturation) 15 秒，於 60°C 下重鍊 (annealing) 15 秒，於 72°C 下延展 (extension) 45 秒進行 40 個循環。在每次循環結束時，同時於 72°C 偵測粒線體 ND1 與 β -actin 基因之螢光值，並且以 ABI Prism SDS 軟體 (Applied Biosystems) 進行分析，得到循環數閾值 (Cycle threshold [Ct])，進而計算出 ND1/ β -actin 的相對含量。每個樣品皆被以二重複執行，二重複之變異係數 (C.V) 平均為 1.35%。

MnSOD 與 OGG1 基因多形性分析

基因型是以從周邊血液 buffy coat 所萃取出來的基因組來進行。MnSOD Ala-9Val 基因型的決定，是根據 Ambrosone 等人⁽⁸⁹⁾於 1999 年所描述的方法所執行。簡單地說，對於 MnSOD 基因的分析，是先進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR]) 增幅後，再以限制片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 分析來偵測 NgoMIV 作用點的差異。用以增幅 MnSOD 基因的引發子序列為 5'-ACC AGC AGG CAG CTG GCG CCG G-3' 以及 5'-GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG-3'。0.5- μL 的 DNA 模版被加入至包含有 200 ng 的引發子、1.5 mM MgCl_2 、0.2 mM 之去氧核苷三磷酸 (dNTPs)、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl pH 8.3、以及 0.1% 的胎牛血清白蛋白 (BSA) 的 PCR 緩衝溶液中，最終體積以蒸餾水調成 50 μL 。PCR 循環參數組成為 94°C 四分鐘的先前培養，接續 35 回合的循環，在 94°C 一分鐘 (變性)， 61°C 一分鐘 (重鍊)，以及 72°C 一分鐘 (延展)；反應於最後的 72°C 五分鐘的延展後終止。PCR 的產物將再進行 NgoMIV 限制酶消化，消化後產物於 3.0% 瓊膠中進行電泳後，再以 ethidium bromide 染色判讀。同型 Val/Val 基因型的個體表現出一段 107 bp 的產物片段，同型 Ala/Ala 基因型的個體顯示出一段 89 bp 以及一段 18 bp 的產物片段，而異型 Val/Ala 基因型的個體則具有所有三段產物片段。相似於 MnSOD 基因分析，根據 Aka 等人⁽⁹⁰⁾於 2004 年所描述的方法，以 PCR 為基礎的 RFLP 被執行來偵測 OGG1 基因型，在密碼子 326 的 Ser 至 Cys 置換被增幅以產生 234 bp 的未消化片段。使用的引發子序列為 5'-CCC AAC CCC AGT GGA TTC TCA TTG C-3' 和 5'-GGT GCC CCA TCT AGC CTT GCG GCC CTT-3'。在 94°C 四分鐘的先前變性後，循環條件如下，35 回合循環在 94°C 三十秒， 61°C 三十秒， 72°C 三十秒，以及最終於 72°C 五分鐘的延展。而 PCR 的產物然後於 37°C 下以 Fnu4HI 限制酶進行消化，並且在 2.5% 的瓊膠中分離。同型 Ser-Ser 基因型的個體表現出 213 以及 21 bp 兩個產物片段，同型 Cys-Cys 基因型的個體顯現出一段 164、49 bp 以及 21 bp 片段，而異型 Ser-Cys 基因型的個體則有 213、164、49 及 21 bp 四個片段。

統計分析

對於研究對象的收案年齡、性別、農藥暴露時程、果園面積、現今抽菸狀況、以及抽菸包年於高與低農藥暴露及對照組間的比較，是利用Student's *t*-test與ANOVA來針對連續變項進行檢定， χ^2 test則用以檢定類別變項。 χ^2 test或Fisher's exact test被使用來檢定在高、低農藥暴露與對照組間MnSOD以及OGG1基因型的盛行率。後續上，根據農藥暴露與不同因子進行分層分析以評估相對粒線體DNA含量；ANOVA被使用來比較在不同農藥暴露狀態間的粒線體DNA含量之差異，Student's *t*-test則被使用來檢定相對粒線體DNA含量與年齡、性別、抽菸狀況和MnSOD以及OGG1基因之間的相關。這些變項與相對粒線體DNA含量的相關則進一步地以簡單直線迴歸模式 (general linear model [GLM]) 評估；最後，最小平方均 (least-squares mean) 被執行來預測攜帶易感受性基因之不同合併狀況者的調整後相對粒線體DNA含量。此外，GLM也被執行來檢定相對粒線體DNA含量的任何趨勢。全部數據以SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) 分析，並且統計檢定是以雙尾檢定所執行。

結果

共有 120 位農藥暴露的研究對象與 106 位未暴露的對照被納入分析，研究對象的人口學特質整理於表 1。研究對象的平均年齡為 52.9 ± 0.8 (標準誤) 歲，以及 17.7% 的研究對象為現今抽菸者。果園面積在高、低農藥暴露組間達到統計顯著差異 ($P < 0.01$, *t*-test)，而年齡 ($P = 0.75$)、性別 ($P = 0.13$, χ^2 test)、農藥暴露時程 ($P = 0.27$)、現今抽菸者的比例 ($P = 0.19$)、以及抽菸包年 ($P = 0.16$) 在高、低農藥暴露組間並未達到統計顯著差異。相對地，對照組相較於農藥暴露組在年齡上是顯著地較為年輕 ($P < 0.01$, ANOVA)、男性比例較少 ($P < 0.01$) 以及具有較少的抽菸包年 ($P < 0.01$)。

研究對象的 MnSOD 以及 OGG1 基因型比例呈現於表 2。在研究對象中，MnSOD Val 與 Ala 對偶基因的比例分別為 86.9% 與 13.1%，OGG1 Ser 與 Cys 對偶基因的比例分別為 37.4% 與 62.6%。MnSOD ($P = 0.15$, Fisher's exact test) 與 OGG1 ($P = 0.23$) 基因型比例在不同農藥暴露分組間並未達到統計顯著差異，並且符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。

整體平均粒線體 DNA 相對含量為 103.2 ± 6.3 (mtDNA/ β -actin；比)，表 3 呈現出測試對象之各個因子與粒線體 DNA 相對含量之間的初步相關性。在本研究中，經歷高農藥暴露 (114.3 vs. 88.2； $P = 0.05$, *t*-test) 以及低農藥暴露 (119.2 vs. 88.2； $P = 0.08$) 的個人分別相較於對照皆具有較大的粒線體 DNA 相對含量。相同地，吸菸包年數較多者也顯示出顯著較大的粒線體 DNA 相對含量 (135.6 vs. 98.5； $P = 0.04$)；而粒線體 DNA 相對含量在年齡大於 53 歲者 (全部研究對象之平均年齡； $P = 0.98$) 以及男性 ($P = 0.93$) 中則未被發現統計上顯著差異。分析測試對象之 MnSOD 與 OGG1 基因型與粒線體 DNA 相對含量之間的初步相關性，則較大的粒線體 DNA 相對含量在攜帶 OGG1 Ser-Ser 基因型者中被發現 (vs. Ser-Cys 與 Cys-Cys； $P = 0.05$, ANOVA)；然而，並沒有明顯的相關性在粒線體 DNA 相對含量與 MnSOD 基因型間被發現，無論是在高、低暴露組及對照組間。

以粒線體 DNA 相對含量為應變項，年齡、性別、抽菸習慣、農藥暴露、以及 MnSOD 與 OGG1 基因型為自變項的多變項迴歸模式 (GLM) 呈現於表 4。因為 MnSOD Ala-Ala 基因型者的個數很小，因此 MnSOD Val-Ala 與 Ala-Ala 被歸類在一起分析。此外，因為攜帶至少一個 OGG1 Cys 對偶基因者，原先已經被顯示相較於攜帶 OGG1 Ser 對偶基因者呈現較低的酵素活性⁽⁸³⁾，於是攜帶至少一個 OGG1 Cys 對偶基因者被歸類為 OGG1 Ser-Cys/Cys-Cys 基因型。我們的多變項迴歸模式結果顯示，粒線體 DNA 相對含量是正向相關於抽菸狀態大於十包年者 ($P = 0.06$)；相較於對照，高農藥暴露之個人 ($P = 0.07$)、以及低農藥暴露之個人 ($P = 0.03$) 也呈現顯著較高的粒線體 DNA 相對含量平均差異。有趣的是，較大差異的粒線體 DNA 相對含量也在 OGG1 Ser-Ser 基因型者 ($P = 0.03$) 被觀察到，相較於 OGG1 Ser-Cys/Cys-Cys 基因型者。然而，當以 GLM 檢驗我們的資料時，年齡 ($P = 0.49$)、性別 ($P = 0.34$)、MnSOD 基因型 ($P = 0.25$) 明顯地並沒有影響個人的粒線體 DNA 相對含量。

隨後，最小平方均 (least-squares mean) 被執行以評估在調整抽菸狀態的效應後，具有不同農藥暴露狀態且攜帶不同 OGG1 基因型研究對象之粒線體 DNA 相對含量 (圖 1)。為增加統計檢定力，因此我們將高、低農藥暴露者合併為農藥暴露組。在未暴露農藥的對照中，攜帶 OGG1 Cys-Cys 基因型的個人顯現出最低的粒線體 DNA 相對含量 (73.0, $n = 46$)，攜帶 OGG1 Ser-Cys 基因型的個人顯現出增加的粒線體 DNA 相對含量 (96.5, $n = 48$)，攜帶 OGG1 Ser-Ser 基因型的個人則呈現最高的粒線體 DNA 相對含量

(130.1, $n = 12$)；並且增加的趨勢在未暴露農藥之對照的 OGG1 基因型間呈現統計顯著性 ($P = 0.02$, GLM)。相同的趨勢在農藥暴露組中也被觀察到，攜帶 OGG1 Cys-Cys 基因型的個人呈現較低的粒線體 DNA 相對含量 (107.4, $n = 37$)，攜帶 OGG1 Ser-Cys 基因型的個人表現出增加的粒線體 DNA 相對含量 (111.6, $n = 69$)，而攜帶 OGG1 Ser-Ser 基因型的個人則顯現出最高的粒線體 DNA 相對含量 (150.4, $n = 14$)。更進一步地，攜帶 OGG1 Ser-Ser 基因型的農藥暴露者相較於攜帶 OGG1 Cys-Cys 基因型的對照，具有最大差距的粒線體 DNA 相對含量 (150.4 vs. 73.0, $P < 0.01$)。

討論

對於暴露於潛在致癌物質的族群所進行的基因生物偵測，是其遺傳疾病或癌症發生的一項早期警示系統。本研究的結果，顯示出暴露到複雜的農藥混合物之個體其周邊血液的粒線體 DNA 含量具有增加的情形。並且，抽菸狀態大於十包年者以及攜帶 OGG1 Ser-Ser 基因型的個人是正向相關於粒線體 DNA 相對含量。

暴露於不同種類的農藥，可能導致農藥接觸者之氧化壓力產生⁽⁹¹⁾。過去的研究指出台灣最廣泛使用的有機磷農藥，主要是經由肝臟細胞色素 P450 (cytochrome P450) 3A4 及 3A5 酵素所代謝，形成具有高度活性的中間產物 organophosphorus-oxo^(92, 93)。倘若，當個體對於農業化學物種進行代謝後所產生的高度活化產物無法被有效地去除時，則可能會對細胞產生氧化壓力，進而導致 DNA 傷害⁽²⁶⁾。農藥所導致的毒性也被認為可能與粒線體傷害效應有關⁽⁹⁴⁾，因為人類粒線體 DNA 缺乏組織蛋白的保護，並且欠缺高效率的 DNA 修復機制，相較於細胞核 DNA 是較容易遭受氧化性傷害且持續存在著⁽³⁰⁾。先前的研究已經驗證有機磷農藥可對哺乳動物細胞粒線體產生毒性⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾；進一步地，Sitkiewicz 等人⁽⁹⁵⁾則探討四種有機磷殺蟲劑於老鼠大腦突觸體的氧化傷害，結果顯示其中有機磷殺蟲劑 Ronnel 之代謝產物 OAR (oxygen analogue of Ronnel) 濃度升高，可抑制細胞呼吸作用以及降低細胞色素 c 氧化酶與 NADH:細胞色素 c 還原酶之酵素活性。由於粒線體在細胞能量的提供、內生性反應氧化物種的產生以及細胞凋零之機制上扮演一個重要的角色，先前的研究也發現粒線體功能缺損與癌症生成是具有密切的相關性⁽³⁷⁻⁴⁷⁾；因此，農藥暴露所導致的粒線體功能缺損也可能貢獻於致癌過程中。現今的研究則藉由評估粒線體 DNA 含量的增加以驗證農藥暴露對於粒線體基因體的傷害，而我們的農藥暴露對象也顯示具有較高的粒線體 DNA 傷害程度，此結果可能是源由自農藥暴露者之個體內產生氧化壓力及氧化性 DNA 傷害，使得粒線體呼吸功能缺損，組織細胞則藉由促進粒線體 DNA 複製來進行補償作用。特別的是，我們也觀察到高農藥暴露程度者相較於低農藥暴露程度者具有略低的粒線體 DNA 含量，這可能是在低氧化壓力時，氧化性 DNA 傷害可能促進粒線體 DNA 複製與補償作用⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾；而個體處於高氧化壓力時，DNA 複製與補償作用可能因 DNA 結構嚴重受損而較無法有效進行。

DNA 傷害的移除與修補功能在保護基因體的完整性中擔任關鍵的角色；而個人具有 DNA 修補缺陷就可能呈現 DNA 傷害增加及癌症發生之較高的危險。在粒線體中，主要是經由 DNA 鹼基切除修補路徑來修補粒線體的 DNA 氧化損傷⁽⁴⁾；而 OGG1 蛋白也被認為在人類粒線體 DNA 傷害的修補上扮演重要角色⁽⁷⁷⁾，OGG1 326Ser 對偶基因表現的蛋白質被建議其對 8-oxoG 傷害之修復能力是較高於 326Cys 對偶基因表現的蛋白質⁽⁸³⁾。分子流行病學研究探討人類 OGG1 基因多形性與改變癌症危險間的可能相關；然而結果卻是分歧^(82, 84-86)。在本研究中，我們觀察到相較於 OGG1 Ser-Cys/Cys-Cys 基因型的個體，攜帶 OGG1 Ser-Ser 基因型的果農 (特別是低農藥暴露者) 有顯著較高的粒線體 DNA 含量。此結果建議著，一旦我們的農藥暴露對象具有較高的粒線體 DNA 氧化壓力時，攜帶 OGG1 Ser-Cys/Cys-Cys 基因型的個體相較於 Ser-Ser 基因型者其修補粒線體 DNA 損傷之能力較差，DNA 複製與補償作用可能因結構嚴重受損而較無法有效進行⁽⁶¹⁻⁶³⁾。而粒線體 DNA 的複製主要是由對於粒線體具有專一性的 DNA 聚合酶 γ (polymerase γ [Pol γ]) 所負責^(98, 99)，並且 Pol γ 可能因為受到不同程度的氧化壓力調控而有雙向的表現。先前的研究以光照誘發視網膜氧化性傷害，發現視網膜光受器突觸尾端之粒線體 OGG1 蛋白與 Pol γ 表現量具有同時增加的情形⁽¹⁰⁰⁾；但是，研究亦顯示老鼠大腦中粒線體的 Pol γ 活性有隨著年齡下降的情形⁽¹⁰¹⁾，以及 Pol γ 會受到氧化性的傷害而降低活性⁽¹⁰²⁾。因此，在我們的農藥暴露之果農中所觀察到的 OGG1 Ser326Cys 基因多形性對於粒線體 DNA 傷害的表現，也可能是因為個體所承受之氧化壓力程度差異，進而影響到 Pol γ 在細胞補償機制中的表現。然而，Pol γ 與 OGG1 蛋白之間對於農藥暴露所導致之 DNA

傷害的交互作用，需要後續相關研究加以驗證。

超氧化物歧解酶 (SOD) 可藉由清除自由基所造成的氧化傷害來保護細胞。在粒線體中，MnSOD 負責催化超氧化自由基的歧解，而產生過氧化氫與氧⁽²⁾。MnSOD 基因多形性在氨基酸密碼子-9 位置從 valine 轉變成為 alaine，會造成蛋白運輸的缺失以及 MnSOD 活性降低⁽³⁾。最近的研究觀察到，攜帶 MnSOD Ala 對偶基因的農藥暴露者具有較高的帕金森氏症發生危險⁽⁶⁸⁾，並且認為農藥代謝產生的超氧化自由基可能與變異的 MnSOD 基因型具有相關性。在我們的研究中，農藥是可能導致農藥暴露者之氧化壓力的產生，並且攜帶變異 MnSOD 基因型者因無法有效地將自由基清除，是可能導致較高的粒線體 DNA 傷害；然而，我們並無法觀察到顯著的相關於 MnSOD 單獨角色與增加的粒線體 DNA 傷害間，無論是在高農藥暴露組或在其他分組。這可能的原因是，MnSOD Ala 對偶基因於本研究之果農農藥暴露者的比例為 13.1%，並且 Ala-Ala 攜帶者並無法在我們的農藥暴露者中被偵測到；第二型錯誤 (type II error) 的可能亦即不充分的統計檢定力之結果是無法被排除，因此進一步研究是需要更大的樣本數目。

在我們的農藥暴露之果農研究中，抽菸包年數較多者也顯示出顯著較大的粒線體 DNA 相對含量。香煙包含許多致癌性物質如苯並芘 (benzo[a]pyrene)，以及大量的自由基型態的物質如對苯二醌 (hydroquinone)；這些有機自由基以及毒性物質可能傷害粒線體 DNA⁽¹⁰³⁾。進一步地，吸菸已經被觀察到可能會抑制血小板中粒線體的酵素活性、造成肺泡巨嗜細胞的粒線體功能障礙^(104, 105)、以及相對於淋巴球細胞之呼吸鏈傷害⁽¹⁰⁶⁾。原先的研究報告也顯示，抽菸相對於粒線體 DNA 含量增加^(1, 53)；粒線體 DNA 含量的增加被認為可能是由於補償機制的的作用，以補償因香煙暴露所增加的粒線體氧化性傷害以及粒線體呼吸功能的改變。特別的是，戒菸數十年後之戒菸者，其抽菸相關的粒線體 DNA 變異仍然長期存在著⁽⁵³⁾；粒線體 DNA 的增加被認為是菸草暴露的慢性傷害所引起的長期回饋效應。

原先的研究報告顯示，粒線體 DNA 傷害會隨年齡的增加而增加⁽¹⁾。另外，Liu 等人⁽⁵⁶⁾則發現，正常人的白血球細胞內粒線體 DNA 的含量會隨著年紀的增加而上升，但超過 55 歲後便開始下降。在我們的農藥暴露之果農研究中，年齡則是未呈現相關於增加的粒線體 DNA 含量，這可能是由於參與本研究的對象其年齡範圍較小 (52.9 ± 0.8)，因此我們無法觀察年齡增加與粒線體 DNA 含量的變化趨勢。除了年齡之外，性別在本研究中也未能顯示相關於增加的粒線體 DNA 含量，並且也沒有醫學文獻的資料顯示實質上的性別差異。

在我們研究對象中，MnSOD Ala 對偶基因為 13.1%，是相似於台灣人研究的基因頻率 (13.9-30.0%)⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾。而我們的研究對象 OGG1 Ser 對偶基因的比例為 37.4%，也是相似於華人研究的 OGG1 Ser 對偶基因頻率 35.9-43.0%⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾。並且 MnSOD 與 OGG1 基因多形性的頻率皆符合哈溫平衡；這些結果證實我們基因型技術的可信性和成果。本研究為橫斷式研究，有許多先天的限制。會參與研究的研究對象，一般來說會比其他已停止工作者健康。而重建個人原先的農藥暴露史，包括在處置農藥時的個人保護程度，通常是困難的工作。在本研究中，可獲得的過去暴露資料不足，並且缺乏對於累積暴露量的定量估計；而個人暴露資料是在未知健康狀態下所獲得，因此，暴露的錯誤分組可以被假設是沒有方向的，並且假如存在，將傾向於低估 DNA 傷害的危險性。

總體而言，我們的結果顯示農藥暴露者具有較高的粒線體傷害危險，而 OGG1 基因可能修飾農藥暴露的果農其粒線體 DNA 傷害之效應。

致謝

我們感謝東勢農民醫院的黃興舒先生與陳秀珠小姐，以及 Minnesota Mining and Manufacturing (3M) 台灣分公司在行政上的大力協助。本研究是由行政院國家科學委員會所補助 (NSC-95-2314-B040-038)。

參考文獻

1. Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YH. Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett* 1998;441:292-6.
2. Robinson BH. The role of manganese superoxide dismutase in health and disease. *J Inher Metab Dis* 1998;21:598-603.
3. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide

- dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:561-5.
4. Bohr VA, Stevnsner T, de Souza-Pinto NC. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* 2002;286:127-34.
 5. Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, et al. Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 1995;270:14659-65.
 6. de Souza-Pinto NC, Hogue BA, Bohr VA. DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. *Free Radic Biol Med* 2001;30:916-23.
 7. Kim JI, Park YJ, Kim KH, Kim JI, Song BJ, Lee MS, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:956-60.
 8. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human, Vols. 5-53. Lyon, France: IARC; 2003.
 9. Zahm SH, Ward MH, Blair A. Pesticides and cancer. *Occup Med* 1997;12:269-89.
 10. Zahm SH, Ward MH. Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1998;3:893-908.
 11. Daniels JL, Olshan AF, Savitz DA. Pesticides and childhood cancers. *Environ Health Perspect* 1997;105:1068-77.
 12. Khuder SA, Mutgi AB. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med* 1997;32:510-6.
 13. Dearfield KL, McCarroll NE, Protzel A, Stack HF, Jackson MA, Waters MD. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloroacetanilides and related compounds. *Mutat Res* 1999;443:183-221.
 14. Dearfield KL, Stack HF, Quest JA, Whiting RJ, Waters MD. A survey of EPA/OPP and open literature data on selected pesticide chemicals tested for mutagenicity. I. Introduction and first ten chemicals. *Mutat Res* 1993;297:197-233.
 15. Garrett NE, Stack HF, Waters MD. Evaluation of the genetic activity profiles of 65 pesticides. *Mutat Res* 1986;168:301-25.
 16. Bolognesi C, Parrini M, Bonassi S, Ianello G, Salanitto A. Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides. *Mutat Res* 1993;285:239-49.
 17. Kourakis A, Mouratidou M, Barbouti A, Dimikiotou M. Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. *Carcinogenesis* 1996;17:99-101.
 18. Antonucci GA, de Syllos Colus IM. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000;20:265-72.
 19. Scarpato R, Migliore L, Angotzi G, Fedi A, Miligi L, Loprieno N. Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. *Mutat Res* 1996;367:73-82.
 20. Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T, et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat Res* 2000;464:255-62.
 21. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
 22. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-65.
 23. Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991;196:137-40.
 24. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992;256:628-32.
 25. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891-9.
 26. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006;5:145-52.
 27. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922-33.
 28. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts:

- requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.
29. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-6.
 30. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:514-9.
 31. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242:1427-30.
 32. McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG. Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res* 2004;29:589-600.
 33. Lestienne P, Bataille N. Mitochondrial DNA alterations and genetic diseases: a review. *Biomed Pharmacother* 1994;48:199-214.
 34. Lee HC, Yin PH, Yu TN, Chang YD, Hsu WC, Kao SY, et al. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues -- effects of betel quid chewing and oral cancer. *Mutat Res* 2001;493:67-74.
 35. Tan DJ, Chang J, Chen WL, Agress LJ, Yeh KT, Wang B, et al. Novel heteroplasmic frameshift and missense somatic mitochondrial DNA mutations in oral cancer of betel quid chewers. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:186-94.
 36. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002;1:9.
 37. Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:972-6.
 38. Liu VW, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, et al. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:5998-6001.
 39. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998;20:291-3.
 40. Maximo V, Soares P, Seruca R, Rocha AS, Castro P, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:136-43.
 41. Nomoto S, Yamashita K, Koshikawa K, Nakao A, Sidransky D. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin Cancer Res* 2002;8:481-7.
 42. Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, Takase T, Taguchi M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Mitochondrial DNA alteration in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2001;92:319-21.
 43. Jessie BC, Sun CQ, Irons HR, Marshall FF, Wallace DC, Petros JA. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Exp Gerontol* 2001;37:169-74.
 44. Liang BC, Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas. *Cancer Lett* 1996;105:167-73.
 45. Maximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol* 2002;160:1857-65.
 46. Ivanova R, Lepage V, Loste MN, Schachter F, Wijnen E, Busson M, et al. Mitochondrial DNA sequence variation in human leukemic cells. *Int J Cancer* 1998;76:495-8.
 47. Reddy PL, Shetty VT, Dutt D, York A, Dar S, Mundle SD, et al. Increased incidence of mitochondrial cytochrome c-oxidase gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2002;116:564-75.
 48. Jia L, Liu KZ, Newland AC, Mantsch HH, Kelsey SM. Pgp-positive leukaemic cells have increased mtDNA but no increased rate of proliferation. *Br J Haematol* 1999;107:861-9.
 49. Yen MY, Chen CS, Wang AG, Wei YH. Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1027-30.
 50. Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Ardite E, Estivill X, Urbano-Marquez A, et al. Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process. *Biochem Mol Med* 1997;62:165-71.
 51. Wang Y, Liu VW, Xue WC, Tsang PC, Cheung AN, Ngan HY. The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: a quantitative study using laser-captured microdissected tissues.

- Gynecol Oncol 2005;98:104-10.
52. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 2000;348:425-32.
 53. Masayeva BG, Mambo E, Taylor RJ, Goloubeva OG, Zhou S, Cohen Y, et al. Mitochondrial DNA content increase in response to cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:19-24.
 54. Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, Berger A, Fink K, Schmeller N, et al. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25:1005-10.
 55. Lee HC, Li SH, Lin JC, Wu CC, Yeh DC, Wei YH. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res* 2004;547:71-8.
 56. Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Lii CK, Ma YS, et al. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res* 2003;37:1307-17.
 57. Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY, et al. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 bp-deleted mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:97-112.
 58. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-20.
 59. Chen K, Thomas SR, Keaney JF Jr. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2003;35:117-32.
 60. Suzuki H, Kumagai T, Goto A, Sugiura T. Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:542-5.
 61. Doudican NA, Song B, Shadel GS, Doetsch PW. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2005;25:5196-204.
 62. Mandavilli BS, Boldogh I, Van Houten B. 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain Research. Brain Res Mol Brain Res* 2005;133:215-23.
 63. Banmeyer I, Marchand C, Clippe A, Knoops B. Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DNA damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 2005;579:2327-33.
 64. Wispe JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1989;994:30-6.
 65. Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res* 1999;423:11-21.
 66. Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 1994;13:1127-36.
 67. Cheng TC, Chen ST, Huang CS, Fu YP, Yu JC, Cheng CW, et al. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the catechol estrogen-metabolizing genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2005;113:345-53.
 68. Fong CS, Wu RM, Shieh JC, Chao YT, Fu YP, Kuao CL, et al. Pesticide exposure on southwestern Taiwanese with MnSOD and NQO1 polymorphisms is associated with increased risk of Parkinson's disease. *Clin Chim Acta* 2007;378:136-41.
 69. Lin P, Hsueh YM, Ko JL, Liang YF, Tsai KJ, Chen CY. Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan. *Lung Cancer* 2003;40:123-9.
 70. Millikan RC, Player J, de Cotret AR, Moorman P, Pittman G, Vannappagari V, et al. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African Americans and whites. *Breast Cancer Res* 2004;6:R264-74.
 71. Tamimi RM, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Hunter DJ. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:989-96.
 72. Stoehlmacher J, Ingles SA, Park DJ, Zhang W, Lenz HJ. The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:235-8.
 73. Wilson SH, Kunkel TA. Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol* 2000;7:176-8.
 74. Xu YJ, Kim EY, Demple B. Excision of C-4'-oxidized deoxyribose lesions from double-stranded DNA by

- human apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1 protein) and DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 1998;273:28837-44.
75. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19633-6.
 76. Boiteux S, Radicella JP. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 1999;81:59-67.
 77. Hashiguchi K, Stuart JA, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res* 2004;32:5596-608.
 78. Targ DC, Tsai TJ, Chen WT, Liu TY, Wei YH. Effect of human OGG1 1245C-->G gene polymorphism on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels of leukocyte DNA among patients undergoing chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2338-47.
 79. Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH, Chen CC, Hong AI, Wei YH, et al. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res* 2003;44:31-5.
 80. Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Li ZY, Wang JD, Ding JH, et al. hOGG1 Ser(326)Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer* 2002;99:624-7.
 81. Sugimura H, Kohno T, Wakai K, Nagura K, Genka K, Igarashi H, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:669-74.
 82. Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:1229-34.
 83. Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998;16:3219-25.
 84. Xing DY, Tan W, Song N, Lin DX. Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2001;95:140-3.
 85. Xu J, Zheng SL, Turner A, Isaacs SD, Wiley KE, Hawkins GA, et al. Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002;62:2253-7.
 86. Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, et al. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer* 2000;88:932-7.
 87. Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 2005;42:127-41.
 88. Scarpato R, Migliore L, Hirvonen A, Falck G, Norppa H. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSTT1, and NAT2 genotypes. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:263-9.
 89. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:602-6.
 90. Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res* 2004;556:169-81.
 91. Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 2001;310:107-12.
 92. Levi PE, Hodgson E. Oxidation of pesticides by purified cytochrome P-450 isozymes from mouse liver. *Toxicol Lett* 1985;24:221-8.
 93. Mutch E, Blain PG, Williams FM. The role of metabolism in determining susceptibility to parathion toxicity in man. *Toxicol Lett* 1999;107:177-87.
 94. Yamano T, Morita S. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Arch Environ Contam Toxicol* 1995;28:1-7.
 95. Sitkiewicz D, Skonieczna M, Krzywicka K, Dziedzic E, Staniszevska K, Bicz W. Effect of organophosphorus insecticides on the oxidative processes in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 1980;34:619-26.

96. Knobeloch LM, Blondin GA, Read HW, Harkin JM. Assessment of chemical toxicity using mammalian mitochondrial electron transport particles. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990;19:828-35.
97. Hernandez AF, Lopez O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett* 2005;159:13-21.
98. Sazer S, Sherwood SW. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J Cell Sci* 1990;97:509-16.
99. Ogihara M, Tanno M, Izumiyama N, Nakamura H, Taguchi T. Increase in DNA polymerase gamma in the hearts of adriamycin-administered rats. *Exp Mol Pathol* 2002;73:234-41.
100. Cortina MS, Gordon WC, Lukiw WJ, Bazan NG. Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria. *Exp Eye Res* 2005;81:742-50.
101. Chen D, Cao G, Hastings T, Feng Y, Pei W, O'Horo C, Chen J. Age-dependent decline of DNA repair activity for oxidative lesions in rat brain mitochondria. *J Neurochem* 2002;81:1273-84.
102. Graziewicz MA, Day BJ, Copeland WC. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2817-24.
103. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686:12-27.
104. Smith PR, Cooper JM, Govan GG, Harding AE, Schapira AH. Smoking and mitochondrial function: a model for environmental toxins. *Q J Med* 1993;86:657-60.
105. Aoshiha K, Tamaoki J, Nagai A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1392-401.
106. Miro O, Alonso JR, Jarreta D, Casademont J, Urbano-Marquez A, Cardellach F. Smoking disturbs mitochondrial respiratory chain function and enhances lipid peroxidation on human circulating lymphocytes. *Carcinogenesis* 1999;20:1331-6.

計畫成果自評

粒線體DNA (mitochondrial DNA [mtDNA]) 的氧化傷害也已經被推測在細胞死亡與致癌機制上扮演一重要的調節者。在粒線體中，含錳超氧化物歧解酶 (manganese superoxide dismutase [MnSOD]) 為對抗超氧自由基攻擊的第一道防線；OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) 蛋白則也是主要的DNA糖解酶，來修補粒線體DNA 8-oxoG受損部位。然而，對於具有不同人類MnSOD和OGG1基因變異者其在農藥所導致的粒線體基因毒性並未被探討。在本研究中，結果顯示經歷高或低農藥暴露的個人相較於對照，具有較高的粒線體DNA相對含量。有趣的是，在調整可能的干擾因子效應後，多變項迴歸模式顯示OGG1 Ser-Ser ($P = 0.03$) 基因型是顯著相關於增加的粒線體DNA相對含量。然而，並沒有顯著的相關於MnSOD基因型與增加的粒線體DNA傷害間被呈現。因此，我們的結果顯示具有易感受性OGG1基因型之個人，可能對於農藥所導致的粒線體DNA傷害具有增加的危險。如此的結果可提供環境醫學研究對於農藥危害的參考依據。過程中，本研究也提供相關人員環境分子流行病學的相關訓練，與研究經歷。

表 1：農藥暴露果農與一般對照的人口學特質

變項	對照	農藥暴露		全部
		低暴露	高暴露	
個數	106 (46.9%)	55 (24.3%)	65 (28.8%)	226 (100%)
年齡 (歲)	48.9 ± 1.1 [*]	56.8 ± 1.5	56.2 ± 1.4 [†]	52.9 ± 0.8
性別：男性 (%)	38 (35.9%)	28 (50.9%)	42 (64.6%) [†]	108 (47.8%)
農藥暴露時程 (年)	0	28.5 ± 2.4	32.1 ± 2.1	16.2 ± 1.3
果園面積 (公頃)	0	0.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1 [‡]	0.7 ± 0.1
吸菸狀態				
未曾吸菸者 (%)	88 (83.0%)	44 (80.0%)	44 (67.7%)	176 (77.9%)
已經戒菸者 (%)	4 (3.8%)	1 (1.8%)	5 (7.7%)	10 (4.4%)
現今吸菸者 (%)	14 (13.2%)	10 (18.2%)	16 (24.6%)	40 (17.7%)
包年	2.1 ± 0.6	3.6 ± 1.2	6.4 ± 1.4 [†]	3.7 ± 0.6

^{*} 個數或連續變項之平均值 ± 標準誤。

[†] $P < 0.01$; ANOVA，對照與各農藥暴露比較。

[‡] $P < 0.01$; t -test，低暴露與高暴露比較。

表2：農藥暴露果農與一般對照之MnSOD以及OGG1基因型比例

基因型		對照	農藥暴露		全部
			低暴露	高暴露	
個數		106 (46.9%)	55 (24.3%)	65 (28.8%)	226 (100%)*
MnSOD	Val-Val	85 (80.2%)	41 (74.5%)	42 (64.6%)	168 (74.4%)
	Val-Ala	20 (18.9%)	14 (25.5%)	23 (35.4%)	57 (25.2%)
	Ala-Ala	1 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.4%)
OGG1	Ser-Ser	12 (11.3%)	6 (10.9%)	8 (12.3%)	26 (11.5%)
	Ser-Cys	48 (45.3%)	35 (63.6%)	34 (52.3%)	117 (51.8%)
	Cys-Cys	46 (43.4%)	14 (25.5%)	23 (35.4%)	83 (36.7%)

*個數 (百分比)。

表 3：研究對象之各個因子、農藥暴露狀態與平均粒線體 DNA 相對含量 (mtDNA/ β -actin 基因) 之間的初步相關性

變項	對照		農藥暴露				全部	
			低暴露		高暴露			
	個數	平均值 \pm 標準誤	個數	平均值 \pm 標準誤	個數	平均值 \pm 標準誤	個數	平均值 \pm 標準誤
全部	106	88.2 \pm 8.2	55	119.2 \pm 15.9 [‡]	65	114.3 \pm 10.6 ^{*,‡}	226	103.2 \pm 6.3
年齡								
\geq 53 歲	33	82.4 \pm 14.5	34	99.1 \pm 13.9	38	125.5 \pm 14.3	105	103.4 \pm 8.3
< 53 歲	73	90.8 \pm 10.0	21	151.8 \pm 34.3	27	98.4 \pm 15.4	121	103.1 \pm 9.3
性別								
男性	38	70.8 \pm 14.0	28	135.6 \pm 23.8	42	109.5 \pm 11.2	108	102.6 \pm 9.3
女性	68	97.9 \pm 9.9	27	102.2 \pm 20.8	23	123.0 \pm 22.1	118	103.8 \pm 8.6
吸菸狀態								
> 10 包年	7	75.0 \pm 30.6	7	195.1 \pm 45.9 [‡]	15	136.1 \pm 22.8	29	135.6 \pm 18.8 [†]
\leq 10 包年	99	89.1 \pm 8.5	48	108.1 \pm 16.5	50	107.7 \pm 11.9	197	98.5 \pm 6.6
MnSOD								
Val-Val	85	90.7 \pm 9.3	41	119.8 \pm 17.6	42	124.6 \pm 13.8	168	106.3 \pm 7.3
Val-Ala	20	77.4 \pm 17.7	14	117.6 \pm 36.2	23	95.5 \pm 15.5	57	94.5 \pm 12.4
Ala-Ala	1	90.2	0		0		1	90.2
OGG1								
Ser-Ser	12	131.3 \pm 46.8	6	190.6 \pm 75.3	8	117.2 \pm 24.9	26	140.6 \pm 28.1 [†]
Ser-Cys	48	94.5 \pm 9.9	35	104.8 \pm 17.9	34	120.5 \pm 16.2	117	105.1 \pm 8.2
Cys-Cys	46	70.4 \pm 9.7	14	124.6 \pm 29.5	23	104.1 \pm 16.1	83	88.9 \pm 8.8

*ANOVA 被執行對於對照與各農藥暴露之比較；*t*-test 及 ANOVA 也分別被執行對於不同年齡、性別、吸菸狀態以及基因型間之比較。

[†]0.01 < *P* < 0.05。

[‡]0.05 < *P* < 0.10。

表 4：以粒線體 DNA 相對含量 (mtDNA/ β -actin 基因) 為應變項，年齡、性別、抽菸狀態、農藥暴露以及 MnSOD 與 OGG1 基因型為自變項之多變項迴歸模式

變項	迴歸係數	標準誤	P值
截距	91.5	31.3	< 0.01
年齡：每增加一歲之變化	-0.4	0.6	0.49
性別：男性 vs. 女性	-13.4	14.0	0.34
吸菸狀態：> 10 vs. \leq 10 (包年)	39.0	20.3	0.06
農藥暴露			
高暴露 vs. 對照	28.5	15.8	0.07
低暴露 vs. 對照	34.9	16.1	0.03
基因型			
MnSOD：Val-Val vs. Val-Ala/Ala-Ala	16.6	14.3	0.25
OGG1：Ser-Ser vs. Ser-Cys/Cys-Cys	41.6	19.4	0.03

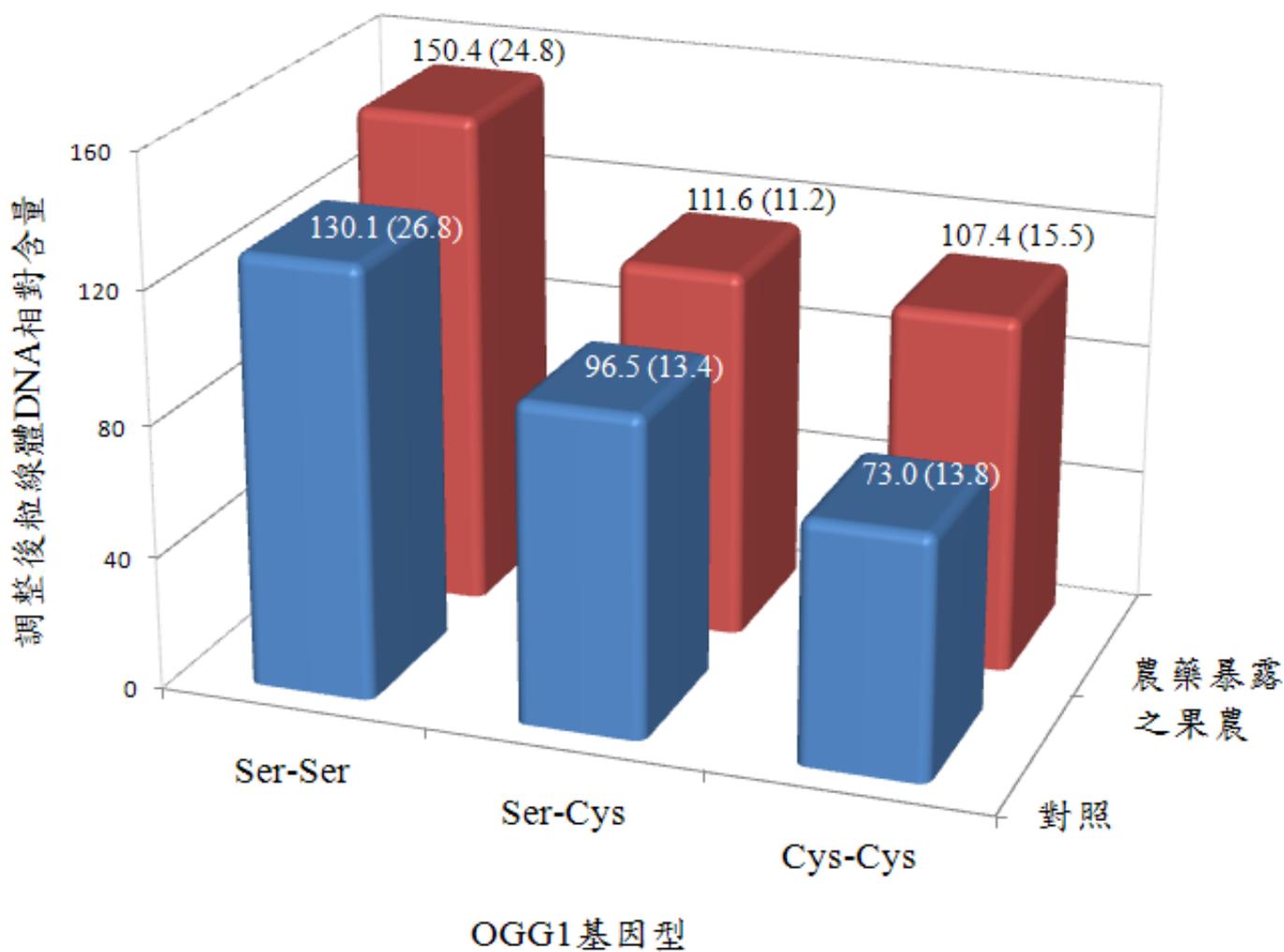


圖 1：在調整吸菸的效應後，不同農藥暴露狀態與 OGG1 基因型研究對象之粒線體 DNA 相對含量 (標準誤)。

參加2009年國際環境流行病學會年會會議出國報告

過去曾參加過世界頂級的學術研討會，由於在會議中所學到的不僅對於研究上邏輯的思考及實驗上實驗技巧的修正都有極大的收穫，於是又再一次提出申請參加2009年國際環境流行病學會 (International Society for Epidemiology [ISEE]) 年會。2009年國際環境流行病學會年會於8月25日至8月29日在愛爾蘭首都都柏林市 (Dublin) 的University College Dublin舉行。會議的進行包括口頭報告與壁報展示部分，而身為台灣代表，我們也於8月26日中午進行壁報展示，向與會學者介紹我們的研究成果。

我們今年於ISEE年會所發表的研究題目是OGG1 genetic polymorphism is associated with mitochondrial DNA damage in pesticide-exposed fruit growers 農藥暴露之果農其OGG1基因多形性相關於粒線體DNA傷害。農藥 (pesticide) 暴露已經在原先的流行病學中被觀察到是相關於若干的惡性腫瘤疾病，粒線體DNA (mitochondrial DNA [mtDNA]) 的氧化傷害也已經被推測在細胞死亡與致癌機制上扮演一重要的調節者。在粒線體中，含錳超氧化物歧解酶 (manganese superoxide dismutase [MnSOD]) 為對抗超氧自由基攻擊的第一道防線；OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) 蛋白則也是主要的DNA糖解酶，來修補粒線體DNA 8-oxoG受損部位。然而，對於具有不同人類MnSOD和OGG1基因變異者其在農藥所導致的粒線體基因毒性並未被探討。在此篇報告中，我們使用即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction [real time qPCR]) 來評估120名經歷農藥暴露的果農與106名未暴露的對照其個人周邊血液的粒線體DNA (ND1基因) 以及核DNA (β -actin基因) 的含量；藉由被定量出的ND1基因

含量除以對應的 β -actin基因含量，計算出粒線體與核DNA之比值，來評估粒線體DNA傷害。問卷被執行以獲取人口學資料、抽菸習慣以及職業史。MnSOD和OGG1基因型則是以聚合酶鏈鎖反應為基礎的限制片段多形性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 分析加以判定。結果顯示經歷高或低農藥暴露的個人相較於對照，具有較高的粒線體DNA相對含量。有趣的是，在調整可能的干擾因子效應後，多變項迴歸模式顯示OGG1 Ser-Ser ($P = 0.03$) 基因型是顯著相關於增加的粒線體DNA相對含量。然而，並沒有顯著的相關於MnSOD基因型與增加的粒線體DNA傷害間被呈現。因此，我們的結果顯示具有易感受性OGG1基因型之個人，可能對於農藥所導致的粒線體DNA傷害具有增加的危險。

本次與會，聽取各國研究單位的研究成果，最大的收穫是感受到相關研究計劃和新技术對生命科學研究的貢獻。而基因體技術應用面的提升，也促使學者對於基因結構改變以及轉譯影響可以加以探討瞭解。並且在實驗室與臨床工作上，可廣泛運用。此外，大會今年也特並對於全球的食品安全進行討論，本人特別感到興趣的是有關於基因食品的未來安全性。基因食品是指透過基因改良技術，把遺傳物質轉移到另一個生物體中，產生新的食品；其目的是要增加食品對於環境的抗性，或是降低生產成本、增加營養成分、延長儲存的期限等目的。然而，世界衛生組織和聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization) 均以提出警告，相比於傳統的食物生產方法，使用基因改造並不會降低食物的安全性。為了安全起見，所有基因改造食物均須接受嚴格安全評估，才可出售。以美國為例，基因改造食物是受到食品藥物管理局、環境保護署及美國農業部所規管，這三個機構負責基因改造食物的安全及環境評估工作；整個評估過程可能長達數年。目前國際間經由基因改造後的產物以玉米、黃豆和馬鈴薯佔多數；但是

基因食品卻不是完全沒有問題，我們必須深思許多懸而未決的疑慮，包括食用基因食品真的沒有危險嗎，如何告知消費者基因食品的安全與可能影響，並且如何不會讓基因食品影響環境生態。特別的是，近期的研究也觀察到基因食品可能對蝴蝶、蜜蜂等昆蟲造成傷害，而且也影響周邊的植物的生長。新的作物產生，勢必對於生態有所衝擊。

此外，全球現今對於過敏與免疫疾病患者的人數眾多，極需尋找新的解決之途徑。而首要的是，要提高民眾對於過敏性疾病的認識，過敏性疾病的發病率極高，流行病學資料顯示約有三分之一以上的人在一生中曾罹患過敏性疾病。過敏性疾病可嚴重至影響患者的生活品質。並且，隨著生活水準的提高，過敏性疾病的發病率越高；然而，基因改造食品的使用對於過敏與免疫疾病患者的產生是否具有一定的影響性，這也是未來值得加以討論的課題。

本人所參與的會議行程豐富、內容精采，對於本人在研究思路的拓廣、研究的進行及實驗之計畫都有莫大助益。最後建議，希望國科會或教育部能多鼓勵研究學者參加大型國際學術會議，不僅能吸收新知更能拓展國際觀。（攜回資料：會議論文摘要）