

行政院國家科學委員會專題計畫成果報告

台灣地區肺癌發生和空氣污染物之相關性研究 (III)：高肺癌死亡率
地區之肺癌患者組織中特異 DNA 鍵結物含量和化學鑑定
Identification of unique DNA adduct(s) in lung tissues from lung cancer patients
living in Taiwan area showing a higher lung cancer mortality rate

計畫編號：NSC 89-2318-B-040-001-M51

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

執行單位：中山醫學院 毒理學研究所

主持人：李 輝

壹、中文摘要

本計劃第二年研究結果中發現肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量遠高於非肺癌患者，且抽菸並不會影響 DNA 鍵結物的形成，這結果再次印證台灣地區肺癌患者肺組織中 BaP-DNA 鍵結物的形成可能主要來自環境暴露。本年度將進一步比較不抽菸男女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量，以釐清女性對環境污染物是否有較高之感受性？本年度以 ELISA 及 ³²P-Postlabeling 兩種方法分析 62 位不抽菸之肺癌患者及 20 位不抽菸之非肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物之含量，希望能藉此釐清空氣污染與肺癌形成之相關性。結果發現肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物含量遠高於非肺癌之控制組，且在不抽菸女性肺癌患者非腫瘤組織中之 DNA 鍵結物含量亦高於不抽菸之男性肺癌患者。而不抽菸之男、女性肺癌患者在形成及代謝毒物之 CYP1A1 及 GST-M1 基因之多形性及蛋白表現上則沒有差異，這結果更進一步顯示女性可能對環境污染物有較高之感受性。這結果可能可以用來解釋為什麼

女性不抽菸但有高肺癌發生率的原因。

ABSTRACT

In last year project, our data showed that DNA adduct levels of lung cancer patients were significantly higher than non-cancer control and no difference in adduct levels between smoking and non-smoking lung cancer patients. These results suggest that environmental factors other than smoking may play an important role in lung cancer development in female nonsmokers. The purpose of this study was to elucidate the role of environmental carcinogen exposure in lung cancer development in Taiwanese nonsmokers, based on DNA adduct formation. We collected non-tumorous lung tissues resected from sixty-two nonsmoking lung cancer patients and twenty non-cancer controls to investigate whether differences in susceptibility to DNA adduct formation exist between men and women.

³²P-Postlabeling and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) with polyclonal antibody against BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a] pyrene)-DNA adduct were used to evaluate DNA adduct levels in lung tissues of study subjects. Our data showed that the DNA adduct levels of lung cancer patients determined by both assays were significantly higher than those of non-cancer controls. Moreover, DNA adduct levels in females were markedly greater than in males. The difference in DNA adduct levels could not be explained by genetic polymorphisms of cytochrome P-4501A1 (CYP1A1) or glutathione S-transferase (GSTM1), as determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. These results demonstrate that lung cancer patients have a higher susceptibility to DNA damage than non-cancer controls. In addition, differences in susceptibility to DNA damage derived from environmental carcinogen exposure were observed between male and female nonsmokers. In conclusion, high susceptibility to DNA damage in females may partially explain the high mortality rate of lung cancer in nonsmoking Taiwanese women.

貳、緣由與目的

自民國七十三年以來台灣地區的癌症死亡率中，肺癌一直高居女性首位，而男性亦在民國八十五年首次超

過肝癌為第一大癌症死亡原因 (Ger, et al., 1992; Annual Report of Tobacco, 1993)。而肺癌之男、女性死亡率之比例為 2: 1，又顯示台灣地區女性罹患肺癌而死亡的危險率較其他歐美先進國家為高。但令人意外的是我國女性的抽菸人口僅有百分之四左右。因此台灣地區罹患肺癌之患者的致病原因，僅有不到一半的患者可以抽菸習慣來解釋 (DOH, ROC, Cancer Registry Annual Report, 1998)。過去的研究顯示暴露二手菸的婦女罹患肺癌的危險性是沒有暴露二手菸婦女的 2.6-4.7 倍 (Chen et al., 1990)，暴露其他環境污染物如：廚房油煙的暴露也可能增加不抽菸女性罹患肺癌的危險性，儘管如此不抽菸女性罹患肺癌的致病原因至今仍不清楚。因此推測環境暴露可能是台灣地區罹患肺癌的部份原因。但至今有關環境暴露和肺癌發生的相關性研究，也僅止於流行病學調查。Ryberg et al (1994) 發現抽菸之女性肺癌其肺組織中之 DNA 鍵結物含量遠高於抽菸之男性肺癌患者，因此推測女性有較高之感受性 (Wang et al., 1996; Zang and Wynder, 1996)。因此本年度計劃擬進一步分析 62 位不抽菸之男、女性肺癌患者及 20 位非癌症之控制組肺組織中之 DNA 鍵結物含量，以瞭解不抽菸之女性肺癌患者是否有較高之感受性？同時並探討 DNA 鍵結物的形成和代謝毒物的基因 CYP1A1 和 GSTM1 的基因多形性和不抽菸男、女性肺癌患者 DNA 鍵結物的形成有何相關？

參、結果

為了瞭解不抽菸之女性肺癌患者

對環境污染物暴露是否有較高的感受性？我們利用 ELISA 及 ^{32}P -Postlabeling 方法分析 62 位不抽菸肺癌患者，包括 31 位男性及 31 位女性，以及 20 位非癌症之控制組肺組織中之 DNA 鍵結物含量，結果發現 ELISA 及 ^{32}P -Postlabeling 這兩種方法的分析結果有相當高的一致性 ($r = 0.352$; $p = 0.001$)，但以 ^{32}P -Postlabeling (2.00-165.92 adduct/ 10^8 nucleotides) 方式所測得之 DNA 鍵結物含量卻高於 ELISA (0-145.90 adduct/ 10^8 nucleotides) 所得之結果。 ^{32}P -Postlabeling 的分析與圖如圖一所示，不抽菸之男、女性肺癌患者的 PAHs DNA 鍵結物之表現與圖並無太大差異但在抽菸之肺癌患者則有一較特異 PAHs DNA 鍵結物之表現與圖。同時我們比較肺癌患者與非肺癌患者的 DNA 鍵結物含量，結果發現不論是以 ELISA 或是以 ^{32}P -Postlabeling 方式分析，肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量均高於非肺癌患者，結果如圖二所示，這結果顯示肺癌患者對環境暴露似乎有較高之感受性。我們進一步比較不抽菸之男、女性 DNA 鍵結物的含量，也發現不論在 ELISA 或是以 ^{32}P -Postlabeling 方式分析，女性的 DNA 鍵結物含量均高於男性 (ELISA : 女性 27.29 ± 34.63 adduct/ 10^8 nucleotides , 男性 9.45 ± 18.48 adduct/ 10^8 nucleotides , $p=0.001$; ^{32}P -Postlabeling : 女性 49.23 ± 37.67 adduct/ 10^8 nucleotides , 男性 31.17 ± 25.51 adduct/ 10^8 nucleotides , $p=0.014$)。而在 CYP1A1 及 GSTM1 之基因多形性分析結果在男、女性並

無差異，且基因多形性也與肺癌患者 DNA 鍵結物形成無關(Table1)。若與非癌症之男性控制組相比，只有女性肺癌患者的 DNA 鍵結物含量達顯著的統計意義 (ELISA : OR=6.25 , 95%CI=1.33-31.47 ; ^{32}P -Postlabeling : OR=7.71 , 95%CI=1.48-44.09 ; Table 2)。根據以上的研究成果顯示女性可能對暴露環境污染物有較高的感受性，且不抽菸之肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物可能主要來自環境暴露。

肆、討論

Ryberg et al(1994)的研究指出抽菸之女性肺癌其肺組織中之 DNA 鍵結物含量遠高於抽菸之男性肺癌患者，因此推測女性有較高之感受性，為了進一步證實女性是否對環境污染物的暴露有較高的感受性，我們選取了 62 位不抽菸之肺癌患者進行 DNA 鍵結物的分析，結果發現女性的 DNA 鍵結物含量高於男性且 DNA 鍵結物的含量與 CYP1A1 及 GSTM1 的基因多形性無關。根據本研究室過去的研究結果指出鱗狀上皮細胞癌的肺癌病人大多為 CYP1A1m2/m2 基因形，而計劃中所選取之不抽菸肺癌病人只有 11 位是鱗狀上皮細胞癌 (18% ; 11/62)，這可能是我們無法看到 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 基因多形性相關性的原因。另外，我們由組織免疫染色的結果中知道女性肺癌患者肺組織中的 Ahr 及 CYP1A1 蛋白的表現量高於男性，因此我們推測女性肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物含量較高可能是透過活化 Ahr 路徑，促使 CYP1A1 基因表現所致。

過去曾有研究指出將肺癌患者及

非肺癌患者之週邊淋巴球取出後，以 BPDE 處理並以 ^{32}P -Postlabeling 方式分析其移除 DNA 鍵結物之能力，結果顯示肺癌患者之週邊淋巴球移除 DNA 鍵結物的能力較差，這結果顯示肺癌患者之 DNA 修補能力較正常人差 (Wei et al., 1996; Cheng et al., 1998)，而在頭頸部癌症的相關研究上也有相同的結果 (Gao et al., 1987)。因此我們推測女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量較高可能是由於修補能力較差所致。

另外，也有研究指出暴露廚房油煙可能也是造成不抽菸女性肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物含量較高的原因 (Koo and Ho, 1996 ; Risch et al., 1998)，本研究室過去的研究結果也發現以煎魚油煙萃取物處理肺腫瘤細胞 CL-3 後，可以 LC-MS 分析到 BPDE-N2-dG 鍵結物的存在 (Yang et al., 2000)，這結果進一步確定廚房油煙可能是造成不抽菸女性肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物含量較高的部分原因。

過去的研究結果顯示抽菸的女性肺癌患者其肺組織之 DNA 鍵結物含量較抽菸之男性肺癌患者高且其 p53 突變的形式大多為 G:C T:A (Guinee et al., 1995)，而本研究室過去的研究結果發現台灣不抽菸之女性肺癌患者其 p53 突變的頻率相當低只有 4.3% (2/47) 遠低於不抽菸之男性肺癌病患 (19% , 15/78)。且突變形式與抽菸者不同其突變形式為缺失突變(deletion mutation ; Wang et al., 1998)。這結果顯示台灣不抽菸之女性肺癌病患肺組織中 DNA 鍵結物之形成可能是暴露環境污染物所致。

本計劃的成果顯示女性可能對暴露環境污染物有較高的感受性，且不抽菸之肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物主要來自環境暴露。本計劃之研究成果以發表於 *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 304-310, 2001.

伍、參考文獻

- Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, Chen KW, Chen SG, Lai GM, Huang HH, LeeHH. 1990. Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res* 10: 971-976.
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q. 1998. Reduced DNA capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 7:465-468.
- Gao YT, Blot WJ, Zheng W, Ershov AG, Hsu CW, Levin LI, Zhang R, Fraumeni Jr JF. 1987. Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer* 40:604-609.
- Ger LP, Liou SH, Shen CY. 1992. Risk factor of lung cancer. *J Formosan Med. Assoc* 91: S222-S231.
- Guinee Jr DG, Travis WD, Trivers GE, De Benedetti V MG, Cawley H, Weish JA, Bennett WP, Jett J, Colby TV, Tazellaar H, Abbondanzo SL, Pairolero P, Trastek V, Caporaxo NE, Liotta LA, Harris CC. 1995. Gender

- comparisons in human lung cancer: analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and C-erb B-2 expression. *Carcinogenesis* 16:993-1002.
- Koo LC, Ho JHC. 1996. Diet as confounder of the association between air pollution and female lung cancer: Hong Kong studies on exposures to environmental tobacco smoke, incense, and cooking fumes as examples. *Lung Cancer* 14 Suppl 1: S47-S61.
- Lin P, Wang SL, Wang HL, Chen KW, Lee HS, Tsai KJ, Chen CY, Lee H. 2000. Association of CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase polymorphisms with lung squamous cell carcinoma. *Brit J Cancer* 82(4): 852-857.
- Risch HA, Howe GR, Jain M, Burch JD, Holowaty EJ, Miller AB. 1993. Are female smokers at higher risk for lung cancer than male smokers? A case-control analysis by histologic type. *Am J Epidemiol* 138: 281-293.
- Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Huugen A. 1994. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res* 54: 5801-5803.
- Wang TJ, Zhou BS, Shi JP. 1996. Lung cancer in nonsmoking Chinese women: a case-control study. *Lung Cancer* 14 suppl. 1: S93-S98.
- Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, Lee H. 1998. High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res* 58:328-333.
- Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. 1996. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res* 56:4103-4107.
- Yang SC, Jenq SN, Kang ZC and Lee H. 2000. Identification of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-N2-deoxyguanosine in human adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions. *Chem Res Toxicol*, in press.
- Zang EA, Wynder EL. 1996. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 88: 183-192.

Table 1. The combination effects of CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms on DNA adduct levels of lung cancer patients.

CYP1A1/ GSTM1 Polymorphism	DNA adducts /10 ⁸ nucleotides							
	³² P-Postlabeling*				ELISA**			
	High	Low	OR	95%CI	High	Low	OR	95%CI
C/null	4 [#]	1	2.12	0.17-56.72	3	2	6.55	0.58-169.03
C/positive	3	0	1.29	0.21-8.36	2	1	2.73	0.54-14.47
A,B/null	18	2	2.82	0.41-23.94	14	6	1.71	0.41-7.28
A,B/positive	25	9	1.00		19	15	1.00	
			P = 0.54 for trend				P = 0.04 for trend	

*DNA adduct levels evaluated by ³²P-postlabeling was higher or lower than 15.0 adducts/10⁸ nucleotides considered as high or low.

**DNA adduct levels evaluated by ELISA were detectable or undetectable considered as high or low.

[#]Values are the number of study subjects.

CYP1A1 genotypes: A, m1/m1; B, m1/m2; C, m2/m2.

OR: odd ratio

Table 2. The interaction effects between lung cancer and gender on the DNA adduct levels in entire study subjects.

Lung cancer/ Gender	DNA adducts /10 ⁸ nucleotides							
	³² P-Postlabeling*				ELISA**			
	High	Low	OR	95%CI	High	Low	OR	95%CI
LC/F	27 [#]	4	7.71	1.48-44.09	25	6	6.25	1.33-31.47
LC/M	23	8	3.29	0.76-14.82	13	18	1.08	0.26-4.56
NC/F	3	2	1.71	0.15-21.32	3	2	2.25	0.20-28.67
NC/M	7	8	1.00		6	9	1.00	
			P = 0.003 for trend				P = 0.01 for trend	

*DNA adduct levels evaluated by ³²P-postlabeling was higher or lower than 15.0 adducts/10⁸ nucleotides considered as high or low.

**DNA adduct levels evaluated by ELISA were detectable or undetectable considered as high or low.

[#]Values are the number of study subjects.

LC/F, lung cancer/ female; LC/M, lung cancer/male; NC/F, non-cancer/female; NC/male, non-cancer/male. OR: odd ratio

