

## 壹、中文摘要

過去本研究室已發現 OGG1 基因的表現可作為油煙暴露的生物指標，尤其可用於偵測有抽煙習慣者，而 RT-PCR 則是一種比較簡單、可行的方法。因此本年度計畫以不同之環境污染物，例如都會區空氣懸浮微粒萃取物、二手煙萃取物 (environmental tobacco smokes)、拜香萃取物、汽、機車排放物等處理肺細胞，以了解 OGG1 基因之表現是否適合作為環境暴露之生物指標，初步實驗發現 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理之 WI-38 和 CL-3 細胞，都發現 OGG1 會被誘發而增強表現，因此證實人類肺細胞受到氧化性傷害時，OGG1 基因會被活化表現。當以環境污染物處理 CL-3 細胞時，結果發現以拜香萃取物所誘發之 OGG1 mRNA 表現量為最明顯。另外我們也以實際環境暴露之人群做研究，以廟宇附近之幼稚園女教師做暴露拜香之暴露組，同時以本校女學生為控制組，了解兩組血液淋巴球之 OGG1 基因的表現有何不同，結果發現拜香暴露組之 OGG1 mRNA 的表現頻率為 47.5 % 遠高於控制組只有 3.1 %，此差異性具有統計意義 ( $p < 0.001$ )。另外由多變項邏輯迴歸分析結果顯示拜香暴露組織相對危險性約為控制組之 22 倍。因此綜合以上之結果，我們認為 OGG1 mRNA 的表現可作為暴露環境污染物較敏感之生物指標。

## ABSTRACT

Our previous studies have found that OGG1 gene expression may act as a biomarker of oil smoke exposure, especially when the study population includes smoking groups. In addition, RT-PCR is an ideal method to evaluate OGG1 gene expression in human peripheral blood lymphocytes. In this year project, RT-PCR was performed to elucidate whether OGG1 may be as a reliable exposure biomarker to environmental pollutants, such as urban airborne particulates, environmental tobacco smokes, incense smokes, automobile and motorcycle engine exhausts, etc. The preliminary data showed that in WI-38 and CL-3 cells, OGG1 mRNA expression was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dose-dependent and time-course manner, indicating that oxidative DNA damage induced OGG1 expression. When CL-3 cells were treated with environmental complex mixtures, the expression levels of OGG1 mRNA were the highest by the treatment of incense smokes. Furthermore, an incense smoke exposure population study was performed in this year project. The detection frequency of OGG1 mRNA expression was significantly higher in exposure group (47.5 %) than that in control subjects (3.1 %) who were never exposed by incense smokes ( $p < 0.001$ ). Moreover, after adjusting for age, the exposure risk rate was 22-fold higher in incense smoke exposure, compared with the control group. Therefore, our result suggested that OGG1 mRNA expression may be suitable to act as an environmental exposure biomarker.

## 貳、緣由與目的

近年來台灣地區有關環境暴露和肺癌發生率之相關性研究已有數篇，證實高雄石化工業區附近居民罹患肺癌之危險性較其他地區為高。有關室內污染物和肺癌之相關性研究，例如二手煙和烹調油煙和女性肺癌的形成具有顯著相關。在預防醫學之角度上來看，由分析基因多形性和建立環境暴露之生物指標可能是篩檢出肺癌之高危險群，做為早期偵測肺癌之發

生,減少肺癌死亡率的重要策略。前者可經由分析何種基因多形性是好發肺癌之可能危險群。至今我們已完成細胞色素 P4501A1, P4502E1, NAD(P)H nitrooxidoreductase (NQO1) 和 Glutathion S-transferase 的基因多形性和肺癌發生之相關性研究(Lin et al., 1999a; 1999b; Wang et al., 1999)。後者探討主要環境污染物之代謝基因的表現,例如騎機車者和機車修理工之血液淋巴球的 CYP1A1 mRNA 表現作為健康者暴露空氣污染物之生物指標。另外亦偵測廚師之淋巴球中 CYP1A1 和 CYP2E1 mRNA 表現是否可作為暴露烹調油煙的生物指標。結果發現 CYP1A1 較 CYP2E1 適合作為廚師暴露油煙的生物指標。但是這些參與代謝環境污染物之基因,較易被誘發表現,因此經常受其他非研究對象之干擾因子影響,而無法正確評估,例如廚師之血液 CYP1A1 和 CYP2E1 mRNA 的表現會受到抽煙、喝酒和吃烤肉的影響。且其表現的時間不長,因此必須在一定的時間內完成,否則無法正確測得暴露狀況。因此雖然過去經常以 CYP1A1 基因的表現,作為 coke oven 和其它各種可能暴露較多多環芳香烴污染物的作業員之研究,有的報告認為 CYP1A1 可作為暴露指標,但也有的報告,則認為無法作為暴露指標。這可能是上述的兩種可能原因所造成。因此許多學者都想找到一種基因,對大多數的複雜環境污染物敏感,同時其基因的表現可持續較長的時間,而受到其他干擾因子的影響較小。

已知氧化性緊迫 (oxidative stress) 和人類疾病之發生有相當密切的關係。當體內因 redox cycling 而生成 reactive oxygen species (ROS),常會造成 DNA 氧化性傷害。ROS 可能直接攻擊 DNA 雙股螺旋結構,而造成 DNA 單股或雙股斷裂 (single-strand or double-strand break) 傷害。或可藉由活化某些 DNA 分解酵素,使 DNA 產生斷裂 (Cantoni et al., 1989)。ROS 也會直接修飾 DNA 上的鹼基 (base modification) 而產生各種不同之氧化型鹼基。除了 maldialdehyde-DNA 鍵結物可作為指標之外,其中最常見的 8-hydroxy-guanine (8-OH-G),已成為 DNA 氧化性傷害之指標化合物 (Shen et al., 1995)。Jaruga et al. (1994) 偵測人類肺癌組織和其周圍非腫瘤組織中的修飾鹼基以及 SOD, catalase 和 glutathione peroxidase 活性,其中有 12 種修飾鹼基被偵測到,並發現腫瘤組織中有 DNA 傷害的增加和抗氧化酵素活性降低的現象。Ichinose et al. (1997) 以柴油廢氣懸浮微粒處理小白鼠,發現 8-OH-G 的生成量與腫瘤的發生率呈正相關性。因此在癌症發生上,氧化性緊迫所扮演之直接或間接的角色,都值得進一步探討。Weitzmar et al. (1985) 在體外實驗中利用 BaP 誘導基因突變後加入活化的中性球 (neutrophile) 或是 xanthine oxidase,使之產生大量 ROS 後,發現轉形細胞數目的增加,因此推測氧化性傷害在癌化的促進期亦扮演重要的角色。而烹調油煙會引發活性強的氫氧自由基產生,而造成 MDA-DNA 鍵結物與 8-OH-G 鹼基修飾的產生,對肺癌發生的影響或許與 PAH 所形成的 bulky adduct 同時扮演著 initiator 的角色外,自由基也拌演著 promoter 的角色。若體內調控重要生理功能的基因發生氧化性傷害,可能造成不同層次的影響,其可能之作用機轉為: (1) 直接修飾 DNA 上的鹼基,使得 DNA polymerase 判讀上產生錯誤 (misreading), (2) 作用在其他的轉錄因子,而使轉錄作用受到干擾,和 (3) 作用在某些負責調控基因表現或修補基因的酵素,而間接造成 DNA 傷害。

最近研究發現人類含有 38% 類似酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 之 DNA glycosylase 活性的基因稱為 hOGG1 (Ramana et al., 1998; Radicella et al., 1997; Aburatani et al., 1997)。它和酵母菌中的 OGG1 一樣特異性的參與移除 8-OH-G 的修補工作 (Arai et al., 1997; Kohno et al., 1998; Roladan-Arjona et al., 1997)。最近又發現人類 OGG1 位於第三對染色體的 3p26 p25 之間,有 7421 bp,由七個 exon 所構成。會進行 alternative splicing 而形成四種 transcript

isoforms (Ishida et al., 1999)。另外也發現在許多人類細胞中，實際執行去除 8-OH-dG 的蛋白是 MMH (OGG1) type 1a，有 8-OH-G glycoylase/AP lyase 酵素活性 (Monden et al., 1999)。Fortini et al. (1999) 認為 OGG1 主要扮演 bifunctional DNA glycosylase/AP lyase 8-oxoG-DNA glycosylase (OGG1) 的角色，以移除 8-OH-dG，同時認為此基因是被誘發表現的基因 (inducible gene)。最近有學者將 hOGG1 基因轉殖入中國倉鼠卵巢細胞 AA8 和 AS52 探討 potassium bromide 或 photosensitizer 基因毒物處理，有轉殖 hOGG1 基因的兩株細胞之修補因氧化傷害而造成之 8-OH-dG 的能力都較原有之細胞為高，但是對沒有處理基因毒物，而自然形成之 8-OH-dG 則沒有影響。這結果更顯示 hOGG1 基因主要參與移除被誘發形成之氧化性傷害，而非自然形成的氧化性傷害 (Hollenbach et al., 1999)。Tsurudome et al. (1999) 以柴油引擎排放物由氣管注入 Fisher 344 雌性鼠肺臟，探討肺臟中 8-OH-dG 生成量、修補能力和 OGG1 mRNA 表現間的相關性。結果發現在兩小時的時候，柴油引擎排放物能誘發肺臟形成最高量之 8-OH-dG，但到了第五天，8-OH-dG 的量會回到與沒有處理之控制組一樣的生成量。這顯示在五天之間，肺臟之修補酵素會將 8-OH-dG 移除掉。若分析其修補酵素之活性，則發現處理柴油引擎排放物後，修補酵素之活性會迅速降低，在處理後一天，修補酵素活性達到最低點，但到了第五天誘回復到正常狀態。因此柴油引擎排放物會影響肺臟中移除 8-OH-dG 的酵素活性降低，而導致肺臟會累積較多之氧化性傷害。但有趣的是發現，第五天酵素活性恢復，可能是 OGG1 mRNA 被柴油引擎排放物誘發。在第七天，OGG1 mRNA 的表現量更高。這結果顯示 OGG1 mRNA 暴露環境污染物在較長時間才會被偵測到。推測短時間暴露環境污染物可能誘發 OGG1 mRNA 的能力偏低，除非有較長時間環境暴露，才有可能誘發 OGG1 基因表現。因此以 OGG1 mRNA 表現與否來偵測其環境暴露，可能較為適合。

過去數年來，本研究室一直在篩檢找出類似可能的基因，由初步結果發現一種移除氧化性傷害之生物指標—8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) 的 OGG1 基因可能可作為環境暴露之生物指標。因此本研究擬先以不同之肺細胞株，用不同之環境污染物，例如汽車、機車排放物、二手煙、烹調油煙、不同都會區空氣懸浮微粒有機萃取物等處理不同濃度和時間，以了解 OGG1 mRNA 的表現量是否適合做為暴露環境污染物的生物指標。另外，以一特定污染源—香火鼎盛之廟宇的附近幼稚園教師作為研究對象，分析其血液中 OGG1 mRNA 的表現是否較沒有暴露拜香的本校女同學為高，以驗證 OGG1 基因的表現是否可作為環境暴露的生物指標。

## 參、研究方法和步驟

### 一、細胞株來源與細胞培養

CL-3 和 CL1-0 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，MRC-5 細胞是由台北榮總醫學研究部劉宗榮博士提供，WI-38、A-427、Calu-1 細胞購自美國 American Type Culture Collection (ATCC)公司。細胞培養於 DMEM medium，含有 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 0.22% bicarbonate, 0.03% L-glutamine, 0.03% penicillin / streptomycin (100U/ml)。將細胞置於 5% CO<sub>2</sub>、37°C 恆溫培養箱培養。

## 二、烹調油煙萃取物之製備

取一定量的豬裡脊肉以沙拉油快炒，其所生成之煙先用排油煙機過濾油脂，然後在排氣口處裝設空氣採樣器採得樣品，烹調方式儘量和一般家庭相似。而採樣過的玻璃纖維濾紙剪成一公分見方的小塊泡在 200 ml 丙酮中，以振盪器振盪一小時，然後再以 Whatman No.1 濾紙過濾得丙酮萃取液，以上述方法重覆三次，將所有的丙酮萃取液收集起來，再加入無水硫酸鈉脫水、過濾，此萃取液再經減壓濃縮，其殘留物為炒肉油煙懸浮微粒丙酮萃取物，溶於一定量之有機溶劑，保存於-80°C 冰箱中。

## 三、拜香或香煙萃取物之製備

取拜香或長壽煙點燃分別使其煙能充滿十平方公尺的燃燒箱中，在其上方裝置空氣採樣器，以每分鐘 800 公升的流速收集拜香或香煙之懸浮微粒至玻璃纖維濾紙上，每次收集三十分鐘，所得之拜香或香煙懸浮微粒重量即是減去濾紙之重量，然後再將此濾紙如油煙烹調萃取物之製備方法處理，所取得之有機萃取物即為拜香或香煙丙酮萃取物 (Chen and Lee, 1996)。

## 四、機車排放物之丙酮萃取物之製備

先將引擎發動保持空轉狀態，以一 100 cm 的塑膠軟管接到機車之排氣管，再將此塑膠軟管的一端接到空氣採樣器中，以 800 l/min 的流速收集機車引擎排放物，採樣三十分鐘後所得之玻璃纖維濾紙如上述之方法製備，而所取得之有機萃取物即為機車排放物之丙酮萃取物。

## 五、以不同環境污染物處理肺細胞株

為了了解肺癌細胞株受到環境污染物處理後是否會改變 OGG1 基因的表現，首先將肺細胞培養於 10 cm 培養皿中達八、九分滿之後，以不同的環境污染物，例如汽車、機車排放物、二手煙、烹調油煙、都會區空氣懸浮微粒萃取物之有機萃取物，分別以不同濃度劑量和不同的處理時間培養肺細胞，然後倒掉培養液，並且使用磷酸緩衝液洗過兩次後，收集細胞抽取 RNA，同時也以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作為正控制組。

## 六、血液與相關資料收集

本研究將收集台中市南屯區某廟宇附近幼稚園之 40 位幼稚園教師之血液，作為暴露拜香之暴露環境污染物組。而控制組則選自於本校女學生，共有 64 位，且幾乎無暴露拜香之機會，因此本研究將有 104 位受測者，分析長期暴露拜香環境污染物，是否會誘發淋巴球之 OGG1 mRNA 的表現？所有受測者選定後，將以標準問卷獲得其基本資料，另外每位受試者約抽取 5ml 的血液，以含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管收集。

## 七、淋巴球分離

在採血管中加入淋巴球分離液利用比重原理分離出白血球，分離步驟如下：將含有血液的採血管以 800 rpm 離心 15 分鐘後抽出血清，取一含有 5ml 淋巴球分離液的離心管，將採血管剩下的血球沿管壁緩緩加入，再以 800 rpm 繼續離心 35 分鐘後，離心管會呈現四個分離層，分別為殘餘血清層(黃色)、淋巴球層(灰白混濁)、Ficoll 層(透明)、紅血球層(紅色)，最後用塑膠吸管將淋巴球層吸到 eppendorf，再抽取 RNA。

## 八、Total RNA 萃取

本實驗方法是參照 TRIzol reagent (Life Technology, USA) 所附說明書之步驟進行 RNA 萃取，首先加入 1 ml TRIzol reagent 混合均勻，靜置室溫作用 10 至 15 分鐘，待細胞完全水解後，加入 0.2 ml chloroform 充份混合均勻，離心取上層液再加入 0.5 ml isopropanol，混合均勻靜置 10 分鐘，離心倒掉上層液，加入 75% ethanol 洗去殘留的鹽類和 isopropanol，離心倒掉上層液，最後以 DEPC water 溶解之。

## 九、RNA 純化

將上述的 RNA 加入 10  $\mu$ l 100 mM MgCl<sub>2</sub>/1 M DTT, 0.1  $\mu$ l Rnasin (25-50U), 0.1  $\mu$ l DNase I (6.94 mg/ml), 和 40  $\mu$ l DEPC water, 37°C 反應 30 分鐘以去 DNA, 再以 5 mM EDTA, 750 mM sodium acetate 和 0.1 % SDS 終止反應。並且以 phenol/chloroform 方法萃取，最後再加入 isopropanol 沉澱 RNA，經 75 % ethanol 洗去殘留的鹽類和 isopropanol 之後，離心倒掉上層液再加入適當量的 DEPC water 溶解之，並且測定 260 nm 和 280 nm 的吸光值以計算 RNA 濃度和純度。

## 十、RT-PCR

將上述純化之 RNA 取 5  $\mu$ g 加入 oligo-dT, 經 70°C 反應 10 分鐘後，置於冰上，再加入 4 $\mu$ l 5x first buffer, 2  $\mu$ l 0.1 M DTT, 1 $\mu$ l 10  $\mu$ M dNTP, 1 $\mu$ l Sperscript II reverse transcriptase (200 unit) 混合均勻，42°C 反應 1 小時，最後以 70°C 反應 10 分鐘。再取其中 1  $\mu$ l cDNA 作為 PCR 的模板，PCR 反應條件如下：95°C, 5 min  $\rightarrow$  95°C, 1 min; 52°C, 1min; 72°C, 1 min (27 cycles)  $\rightarrow$  72°C, 10 min，而 primer 之序列為：5'-GCGACTGCTGCGC ACAAGAC-3' / 5'-TCGGGCACTGGCACTTCTGAATGCTCCAC-3' (Chevallard et al., 1998)。

## 十一、統計分析

以 SPSS 統計軟體進行下列統計分析。收集血液淋巴球之各組基本資料與 OGG1 基因表現，皆以卡方檢定( $\chi^2$ -test)分析其在分佈上是否呈顯著差異，並且計算相對危險性以及其 95 % 信賴區間。進一步考慮其他可能會影響分析結果的干擾因子，是否與線香暴露有交互作用的存在，因此利用分層分析計算各層之間的相對危險性和 95 % 信賴區間，以探討基因表現的相關性。最後再利用多變項邏輯迴歸(multiple logistic regression)分析，除了將所有因子納入分析以調整可能的干擾作用，也考慮各因子間的交互作用，而最佳迴歸模式的選擇則使用逐步排除

(stepwise)法來建立。

#### 肆、結果

由上年度計畫的研究結果發現，當 PCR 的 cycle 數為 27 時，OGG1 mRNA 的變化量在線性濃度曲線內，因此我們以 27 cycle 數的 PCR 條件進行下列有關 OGG1 mRNA 的定量分析。初步實驗先分析不同人類肺細胞株 OGG1 基因的表現量，結果如 Fig. 1 所顯示，OGG1 基因在 A427, CL1-0, Calu-1 and H1299 等肺癌細胞株都會顯著表現，但是在台灣肺腺癌細胞株 CL3 的表現量則較低。同時，由 Fig. 1 的結果我們發現在正常的肺細胞株 WI-38 和 MRC-5 中 OGG1 基因的表現量均很低。

進一步為了解氧化性傷害對 OGG1 mRNA 表現的影響，我們以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 WI-38 和 CL-3 細胞，結果發現當 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的濃度劑量為 10  $\mu$ M~200  $\mu$ M 之間，在 CL-3 細胞中 OGG1 的表現量會隨著 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的濃度增加而增加 (Fig. 2)。當以 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理 WI-38 細胞 12 小時後，收集不同時間的細胞並且分析其 OGG1 基因的表現量，結果發現隨著時間增加至 12 小時，其 OGG1 基因的表現達到最高量，在 12 小時之後 OGG1 的表現量會與未處理的細胞表現量相近或甚至於更低。不管濃度劑量或作用時間反應，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對 OGG1 mRNA 的表現都呈線性關係效應 (Fig.3)。這結果顯示 OGG1 基因可以被氧化性傷害所刺激誘發表現。同時，我們也以不同的環境污染源有機萃取物處理 CL-3 細胞，使用兩種濃度劑量 0.1 mg 和 1 mg，結果如 Fig. 4 所示，其中以拜香萃取物所誘發之 OGG1 mRNA 表現最為明顯，並且呈現線性濃度效應。

另外我們也以廟宇附近之幼稚園女教師作為暴露拜香之暴露組，同時以本校女學生作為控制組，分析她們的淋巴球中 OGG1 基因的表現有何不同？以評估 OGG1 mRNA 的表現是否可作為健康人之暴露拜香之生物指標。其中收集了拜香暴露組 40 人和 64 位女學生作為控制組。因此共有 104 個血液樣本作為本研究的對象，由 Table 1 可知，在這二組間的性別、抽煙和喝酒習慣都沒有統計上的差異，但是年齡則有顯著的差異，暴露組的平均年齡約為 30 歲，高於控制組平均年齡高於控制組平均年齡 23 歲。另外在 OGG1 mRNA 的表現上，暴露組和控制組的表現頻率分別為 47.5 % 和 3.1 % (Table 2)，暴露組之 OGG1 mRNA 的表現率遠高於控制組，並且在統計上有顯著的差異(P<0.001)，這結果顯示人們暴露拜香後，血液中淋巴球之 OGG1 基因會被拜香中的化學成份所誘發。

由 Table 1 得知兩組間在年齡的分佈並不一致，因此利用多變項邏輯迴歸分析(multiple logistic regression)來調整可能之干擾作用，同時計算相對危險性 (OR) 以及 95% 信賴區間 (CI)。由 Table 3 迴歸模式分析結果發現，年齡會增強拜香暴露之 OGG1 mRNA 的表現頻率，當控制迴歸模式中的其他變項後，拜香暴露組的相對危險性為 21.51 (95% CI=4.36-106.12)，趨勢檢定 P<0.001。而年齡差異並不會影響 OGG1 mRNA 的表現。

#### 伍、討論

目前的研究已發現人類 OGG1 基因會進行 alternative splicing 而形成四種 transcript isoform (Ishida et al., 1999)，其中主要參與去除 8-OH-dG 修補的蛋白為 MMH (OGG1) type 1a，具有 8-OH-dG glycoxylase/AP lyase 酵素活性 (Mondent et al., 1999)。而我們所分析的片段為

四種 isoform 的 conserve region, 因此本研究計畫所分析的結果為所有 OGG1 isoform mRNA 的總量。Arai et al. (1997) 的研究結果發現 OGG1 基因在心、腦、肝、腎、胰和肌肉等各種不同的器官之表現量均不相同, 但是在肺臟的表現量則有偏低的現象。這結果與我們在肺細胞所觀察到的結果相似, 正常肺細胞 WI-38 和 MRC-5 的 OGG1 的表現量明顯的低於肺癌細胞中的含量。同時, 在由上年度計畫結果發現 OGG1 基因在正常的肺組織中的表現很低。而在我們分析的細胞株中, A427, CL1-0 和 H1299 皆屬於肺腺癌細胞株, Calu-1 則是鱗狀上皮肺癌細胞株, 所以 OGG1 基因的表現量是不受細胞株腫瘤分類所影響。此現象亦發現於上年度計畫所分析的肺癌腫瘤組織中, 其 OGG1 的表現率與其腫瘤分類不具統計相關性。

OGG1 基因產物是一種參與鹼基切除修補系統(base excision repair system)的 DNA glycosylase, 而此修補系統還需要 apurinic/aprimidinic endonuclease (APE)以及 DNA polymerase  $\beta$  等酵素的參與才能完成修補作用。Ramana et al. (1998) 發現 APE 基因可被活性氧(reactive oxygen species; ROS)所誘發表現, 同時, Chen et al. (1998) 也發現 DNA polymerase  $\beta$  可被氧化性傷害(oxidative stress)誘發試劑如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所刺激表現, 而本計畫的研究結果亦發現 OGG1 基因會被相關的基因毒物如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所誘發表現。Tsurudome et al. (1999)將柴油引擎排放廢氣萃取物(diesel exhaust particles)以支氣管內注入給予老鼠, 結果在處理 2-8 小時之後可偵測到 8-OH-G 的含量增加, 而 OGG1 mRNA 則在處理 5-7 天之後被誘發表現, 這與我們在上年度計畫所觀察到的現象相似。過去本研究室曾以 DNA 單股斷裂傷害與 8-hydroxyguanine (8-OH-G)生成來評估烹調油煙所造成的氧化性傷害程度, 結果發現烹調油煙對 WI-38 細胞會造成 DNA 單股斷裂傷害並且具有線性濃度效應關係。同時也發現烹調油煙所處理之小牛胸腺 DNA 以及 CL-3 細胞, 以 ECD-HPLC 和 LC-MS 皆可偵測到 8-OH-G。當我們以油煙萃取物暴露 CL3 細胞時則發現 OGG1 基因會被誘發表現(Cherng et al., 2001; unpublished data)。而在本年度的研究發現有些環境污染源如拜香萃取物、機車排放廢物或二手煙等, 亦會造成氧化性傷害而誘發 OGG1 基因表現。而這些環境污染源中又以拜香萃取物誘發 OGG1 mRNA 表現的能力最強。因此綜合以上的研究結果, 我們認為 OGG1 mRNA 的誘發作用, 在生物體致癌過程中可作為細胞受到氧化性傷害的指標。

個人對環境或職業暴露的反應, 可藉由測定工作環境中致癌物的含量推估個人的潛在暴露劑量(Simon et al., 1997), 但是只能代表可能暴露劑量, 而不是人體吸收體內的劑量, 因此流行病學的研究常發現環境監測的結果與癌症的發生無法呈劑量反應關係。當今分子生物技術的蓬勃發展, 所以我們可以利用分子生物偵測方法, 直接以基因的表現來評估人體暴露致癌物之可能劑量。其中以 RT-PCR 的方法偵測基因表現與否, 可顯示個體是否暴露足以誘發基因表現之環境暴露量, 這是一種比較簡單和迅速的生物分析法(Jukka et al., 1998)。而本研究結果則發現無論在單變項或多變項分析中, 血液中 OGG1 mRNA 的表現與拜香暴露有很強的相關性, 拜香暴露組的相對危險性顯然較控制組高約 22 倍, 同時由上年度計畫分析結果一發現長期高量暴露油煙之餐廳廚師的血液淋巴球中 OGG1 基因表現顯著高於家庭主婦和從未暴露油煙之控制組, 因此, OGG1 基因的表現可作為環境污染源暴露的生物指標, 而 RT-PCR 則是一種比較簡單、可行的方法。

## 伍、參考文獻

- Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.-R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S. and Yokota, J. (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene*, 14, 2857-2861.
- Aburatani, H., Hippo, Y., Ishido, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, K., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K., Asano, M., Fukaskwa, K., Yoshinari, T., Inoue, H., Ohtsuka, E. and Nishimura, S. (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurine, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.*, 57, 2151-2156.
- Cantoni, O., Sestili, P. and Cattabeni, F. (1989) Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, 2, 209-212.
- Chen, C. C. and Lee, H. (1996) Genotoxicity and DNA adduct formation of incense smoke condensates : Comparison with environmental tobacco smoke condensates. *Mutation Res.*, 367, 105-114.
- Chevillard, S., Radicella, J. P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.-F., Oudard, S., Dutrillaus, B. and Boiteux, S. (1998) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene*, 16, 3083-3086.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O. M., Laval, J. and Dogliotti, E. (1999) The two type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J. Biol. Chem*, 274, 15230-15236.
- Hollenbach, S., Dhenaut, A., Eckert, I., Radicella, J. P. and Epe, B. (1999) Overexpression of OGG1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis. *Carcinogenesis*, 20, 1863-1868.
- Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takenoshita, Y. and Sagai, M. (1997) Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, 18, 185-192.
- Ishida, T., Hippo, Y., Nakahori, Y., Matsushita, I., Kodama, T., Nishimura, S. and Aburatani, H. (1999) Structure and chromosome location of human OGG1. *Cytogenet. Cell Genet.* 85, 232-236.
- Jaruga, P., Zastawny, T. H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M. and Olinski, R. (1994) Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Letter*, 341, 59-64.
- Jukka, H., Olavi, P., Markku, P., Hannu, R.(1998) Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzyme P450 enzymes in the human fetoplacental unit: role in intrauterine toxicity. *Critical Reviews in Toxicol.* 28,35-72.
- Kohno, T., Shinmura, K., Tosaka, M., Tani, M., Kim, S.-R., Sugimura, H., Nohmi, T., Kasai, H. and Yokota, J. (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*, 16, 3219-3225.



- Lin, P., Wang, H. J., Lee, H., Lee, H. S., Wang, S. L., H, Y. M., Tsai, K. J., Chen, C. Y. (1999) NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism and lung cancer in Taiwan. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 58, 187-197.
- Lin, P., Wang, S. L., Wang, H. J., Chen, K. W., Lee, H. S., Tasi, K. J., Chen, C. Y. and Lee, H. (1999) Association of CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase polymorphisms with lung squamous cell carcinoma. *Bri. J. Cancer*, in press.
- Monden, Y., Arai, T., Asano, M., Ohtsuka, E., Aburatani, H. and Nishimura, S. (1999) Human MMH(OGG1) type 1a peotein is a major enzyme for repair of 8-hydroxyguanine lesions in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 605-610.
- Radicella, J. P., Dherin, C., Desmarz, F. M. and Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharmyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8081-8085.
- Ramana, C. V., Boldogh, I., Izumi, T. and Mitra, (1998) Activation of apurinic/ apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 5061-5066.
- Roldan-Arjona, T., Wei, Y.-F., Carter, K. C., Klung, A., Anselmino, C., Wang, R.-P., Augustus, M. and Lindahl, T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxy-guanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8016-8020.
- Shen, H. M., Ong, C. N., Lee, B. L. and Shi, C. Y. (1995) Aflatoxin B1-induced 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis*, 16, 419-422.
- Simon, D. S., Michael, J. F., Vernon, E. W., Laurence, S. K. (1997) The molecular epidemiology of lung cancer. *Critical Reviews in Toxicol.*, 27, 319-65.
- Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamato, H., Tanaka, I., Sagai, M., Hirano, H., Nagata, N., Itoh, H. and Kasai, H. (1999) Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, 20, 1573-1576.
- Wang, S. L., Lee, H., Chen, K. W., Tsai, K. J., Chen, C. Y. and Lin, P. (1999) Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer*, 26, 27-34.
- Weizman, S. A., Weitberg, A. B. and Stossel, T. P. (1985) Phagocytes as carcinogens: Malignant transformation produced by human neutrophils. *Science*, 227, 1231-1233.

Table 1. The characteristics of study subjects in this study.

	Total (n=104)	Incense exposure	
		exposure (n=40)	Non-exposure (n=64)
Age <sup>†</sup>		29.58±9.01	22.61±4.09
Sex			
Female	104	40	64
Male	0	0	0
Smoking			
Never	104	40	64
Current	0	0	0
Drinking <sup>a</sup>			
-	103	39	64
+	0	0	0

<sup>†</sup> P<0.001, (t-test)

<sup>a</sup> one sample miss data

Table 2. Effect of incense exposure on CYP1A1, CYP2E1 and OGG1 mRNA expression.

Group	OGG1 mRNA expression (%)		P
	undetectable	detectable	
nonexposure	62 (96.9)	2 (3.1)	
exposure	21 (52.5)	19 (47.5)	P<0.001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Chi-Square test

Table 3. Odds Ratio of OGG1 mRNA expression in incense exposure study subject with different age and incidence status.

	mRNA expression		Crude OR (95% CI)	Adjust OR (95%CI) <sup>a</sup>
	undetectable (n=83)	detectable (n=21)		
Age				
≤ 23	52	5	1.00	1.00
> 23	31	16	5.37 (1.79- 16.10)	2.01 (0.56- 7.25)
Incense				
-	62	2	1.00	1.00
+	21	19	28.05 (6.02-130.67)	21.51 (4.36-106.12)

<sup>a</sup> OR adjusted for age, incense exposure

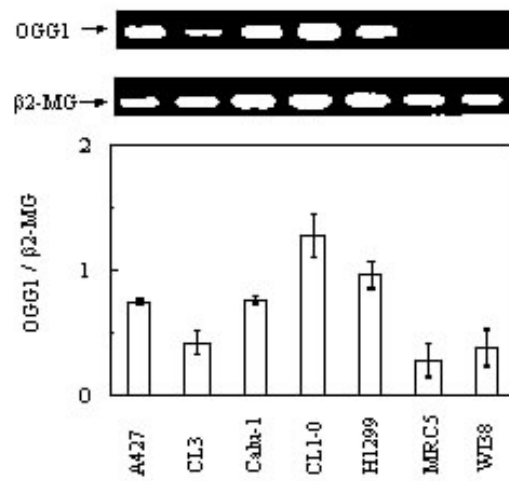


Fig. 1. OGG1 mRNA expression in lung cell line. OGG1 gene expression was detected by RT-PCR and determined using  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-MG) as a reference housekeeping gene.

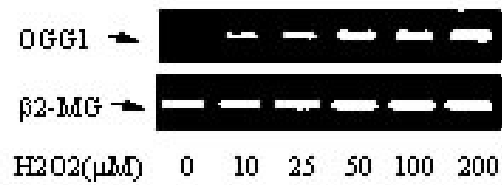


Fig. 2. The dose-response of OGG1 mRNA induction in CL-3 cells. The cells were treated with various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h and harvested from individual dishes. The OGG1 mRNA expression was performed by RT-PCR and determined using β<sub>2</sub>-microglobulin (β<sub>2</sub>-MG) as a reference housekeeping gene.

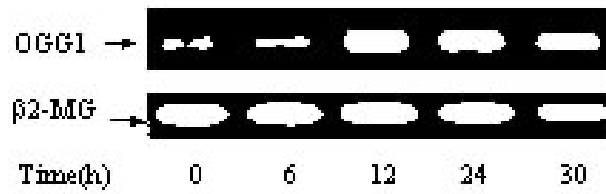


Fig. 3. Kinetics of OGG1 mRNA activation. WI-38 cells were treated with 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and at 0, 6, 12, 24 and 30 h after treatment, the cells were harvested from individual dishes. The OGG1 mRNA expression was performed by RT-PCR and determined using  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-MG) as a reference housekeeping gene.

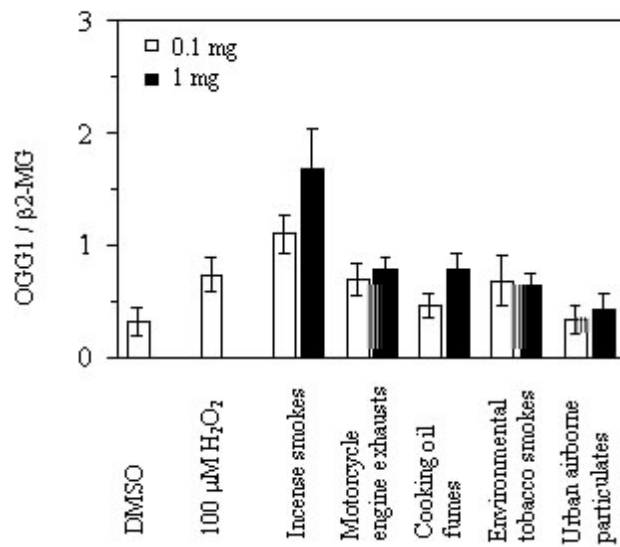


Fig. 4. The expression of OGG1 mRNA in CL-3 cells after treatment of DMSO, 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or various environmental pollutants. The OGG1 mRNA was analyzed by RT-PCR with β2-microglobulin (β2-MG), a reference housekeeping gene, acting as an internal control here.