

R
008.8
1022
87

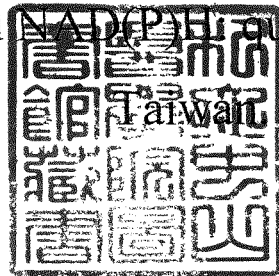
中山醫學院毒理學研究所碩士論文

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

指導教授：林嬪嬪 博士 (P. Lin, Ph. D.)

臺灣地區 Cytochrome P450 IA1、Glutathione S-transferase
M1 及 NAD(P)H: quinone oxidoreductase 基因遺傳多型
態與肺癌的關係

Relationship between Lung Cancer Risk and Genetic
Polymorphism of Cytochrome P450 IA1、Glutathione S-
transferase M1 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase in



研究生：王秀仁 (Hsiu-Jen Wang) 撰

中華民國 八十七年六月
(June, 1998)

中山醫學院圖書館



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: 臺灣地區 cytochrome P450 IA1、Glutathione S-transferase M1 及 NAD(P)H: quinone oxidoreductase 基因遺傳多型態與肺癌的關係

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: 林嬪嬪

研究生簽名: 王香仁 學號: R85505

(親筆正楷)

日期: 民國 87 年 8 月 7 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的是，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。
4. 本案聯絡電話: (02)27377746 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: 王君仁 聯絡電話: (05) 5516888

地址: 雲林縣斗文市正心路 6-6 號

臺灣地區 Cytochrome P450 IA1, Glutathione s-transferase M1 及 NAD(P)H: quinone oxidoreductase

基因遺傳多型態與肺癌的關係

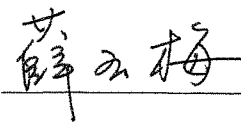
Relationship between Lung Cancer Risk and Genetic Polymorphism of Cytochrome P450 IA1, Glutathione s-transferase M1 and NAD(P)H: quinone oxidoreductase in Taiwan.

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

論文考試委員

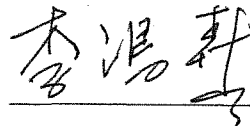
臺北醫學院公共衛生學系

薛玉梅 博士



中山醫學院公共衛生學系

李鴻森 博士



中山醫學院毒理學研究所
(本論文指導教授)

林嬪嬪 博士



中華民國八十七年六月三十日

學生王秀仁論文題目為臺灣地區 Cytochrome P450 IA1、Glutathione S-transferase M1 及 NAD(P)H: quinone oxidoreductase 基因遺傳多型態與肺癌的關係，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：林嬪嬪 博士

簽名：林嬪嬪

中華民國八十七年八月五日

謝 誌

兩年碩士班學習過程中誠蒙恩師 林嬪嬪 博士在待人處世及學業研究上的教誨與指導，於論文撰寫期間不辭辛勞的對本論文的架構與內容悉心斧正，使本論文得以完成，在此致上最深的謝意。

文稿初成，複蒙台北醫學院公衛系薛玉梅博士及本校公衛系主任李鴻森博士撥冗審閱、詳加斧正並提供寶貴意見使本論文更密實周延，謹誌由衷致謝。

研究期間感謝李輝所長的鼓勵與邊樹萱老師的關懷，中山附設醫院檢驗科主任蔡淦仁博士、檢驗科李英毅(老皮)學長、幸珊、淑媛、淑華、瑞芸學姊們幫忙採血收集檢體，國豪學弟協助統計分析，雅文幫忙抽取DNA，朝夕相處的剛璋同學、世般、國文學弟於實驗及生活上的協助，文澈學長幫忙論文修改，佳芳學妹幫忙打字及秀美協助沖洗照片。此外還要感謝陳凌雲老師、廖娟妙老師與浴伶學妹，雖然抗體沒有製備成功但我已學到了研究該有的態度與不怕難的精神。中興大學食品科學研究所康志強學長，元衍、玉怡、君璇、維哲同窗好友，秀足、昭伶、蘭蕙、娟如、培湖、智尹、文虎等可愛的學弟妹，謝謝你們曾給我的幫忙與鼓勵。

最後謹以此論文獻給親愛的外婆及支持我的爸爸媽媽，謝謝你們的包容與支持。

王秀仁 謹誌於

中山醫學院毒理學研究所

中華民國八十七年八月四日

縮寫

1,3- dinitropyrenes	1,3-DNP
1,6- dinitropyrenes	1,6-DNP
1,8-dinitropyrenes	1,8-DNP
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	TCDD
2-amino-3-methylimidazo(4-5-f)quindine	IQ
7,8-diol-9,10-epoxide	BPDE
95% Confidence interval	95% CI
Ah receptor nuclear translocator	ARNT
Aryl hydrocarbon hydrolase	AHH
Aryl hydrocarbon receptor	AhR
Basal medium eagle	BME
Benzo[a]pyrene	B[a]P
Cytochrome P450 IA1	CYP1A1
Cytochrome P450 IB1	CYP1B1
Didecyl sulfate sodium	SDS
Diethylpyrocarbonate	DEPC
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dithiothreitol	DTT
Ethoxyresorufin-O-deethylase	EROD
Ethylene diaminetetraacetic acid	EDTA
Fetal bovine serum	FBS
Glutathione-S-transferase M1	GSTM1
Guanidinium thiocyanate	GTC
NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1	NQO1
Non-essential amino acid	NEAA

Polycyclic aromatic hydrocarbon

PAH

Tris-EDTA buffer

TE buffer

Xenobiotic responsive element

XRE

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	4
第一章 前言	
第一節 肺癌流行病學特徵	7
第二節 肺癌的危險因子	8
第三節 NQO1 酵素功能及與肺癌的關係	11
第四節 CYP1A1 酵素功能及與肺癌的關係	13
第五節 GSTM1 酵素功能及與肺癌的關係	15
第六節 Benzo[a]pyrene 與肺癌的關係	16
第七節 Benzo[a]pyrene 誘導基因表現之能力	18
第八節 研究目的	20
第二章 材料與方法	
第一節 材料	
一、藥品	21
二、檢體來源	22
三、細胞來源	22
四、食用油煙霧製備方式	23
第二節 方法	
一、細胞培養	25
二、DNA 純化	25
三、RNA 純化	26
四、製備互補 DNA (cDNA)	28

五、聚合酵素鍊鎖反應&限制片斷長度多型性 (PCR & RFLP)	28
六、半定量 RT-PCR	32
七、統計方法	35
第三章 結果	
第一節 NQO1 基因多型態與肺癌的關係	38
第二節 CYP1A1 基因多型態肺癌的關係	41
第三節 GSTM1 基因多型態肺癌的關係	43
第四節 variant CYP1A1 基因型且缺乏 GSTM1 基因 與肺癌的關	45
第五節 A427 與 CL-3 細胞株中，B[a]P 對 CYP1A1、 CYP1B1、NQO1、AhR 與 Arnt 基因表現的影響	47
第六節 食用油煙霧對 CL-3 細胞株 CYP1A1 基因表現的影響	50
第四章 結論與討論	51
第五章 參考文獻	59
第六章 圖表	
表一 NQO1 基因多型態分析中肺癌個案與對照組之基 本統計資料	72
表二 肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學 分類之 NQO1 基因型分佈	73
表三 CYP1A1-GSTM1 基因多型態分析中肺癌個案與對 照組之基本統計資料	74
表四 肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學 分類之 CYP1A1 基因型分佈與肺癌的關係	75

表五	肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學分類之 GSTM1 基因型分佈與肺癌的關係	76
表六	同時考慮 CYP1A1 基因型及 GSTM1 基因缺失與肺癌的相關性	77
圖一	肺腺癌之多變項邏輯斯迴歸分析	79
圖二	肺鱗狀上皮癌之多變項邏輯斯迴歸分析	80
圖三	A427與CL-3肺癌細胞株之CYP1A1, GSTM1, NQO1基因多型態	81
圖四	B[a]P 對肺癌細胞株之 CYP1A1 mRNA 表現的影響	82
圖五	B[a]P 對肺癌細胞株之 CYP1B1 mRNA 表現的影響	83
圖六	B[a]P 對肺癌細胞株之 NQO1 mRNA 表現的影響	84
圖七	B[a]P 對肺癌細胞株之 AhR, Arnt mRNA 表現的影響	85
圖八	食用油煙霧(cooking oil fume)對 CL-3 細胞 CYP1A1 mRNA表現的影響	86

第七章 附錄

第一節 不同種族間基因多型態與肺癌相關性研究

第二節 生物醫學年會海報論文摘要

中文摘要

肺癌的發生與暴露於抽煙、石棉及其它環境中的致癌物有關，而這些環境致癌物須經酵素代謝活化，近年來流行病學研究指出，參與致癌物代謝活化與解毒的酵素基因多型態與肺癌有關，如：cytochrome P450 1A1(CYP1A1)、glutathione S-transferase M1(GSTM1)及 NAD(P)H：quinone oxidoreductase (NQO1)。本研究藉著利用 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)，對肺癌個案及非肺癌個案進行基因多型態分析，探討 CYP1A1、GSTM1 及 NQO1 基因多型態對肺癌的影響。

前人研究指出 variant CYP1A1 基因型酵素活性被誘導的程度比其它基因型高，GSTM1 null 基因型缺乏 GSTM1 酵素活性，wild NQO1 基因型之 NQO1 酵素活性也比其它基因型高。基因多型態的實驗結果，利用多變項邏輯斯迴歸分析，顯示抽煙者中同時控制年齡、性別的因素時，wild-type NQO1 基因型(即 NQO1 酵素活性高)會增加罹患肺癌的機會[odds ratio(OR)=3.66, 95% confidence interval: CI, 1.03-13.6]。抽煙者同時是 wild-type NQO1 基因型(即 NQO1 酵素活性高的人若同時抽煙)，則罹患肺腺癌的機率是其他類別的 4.52 倍(OR = 4.52, 95% CI,1.69-12.13)。而 CYP1A1 基因型在同時控制年齡、性別及抽煙等變因後，酵素活性被誘導程度高的 variant CYP1A1 基因型引發肺鱗狀上皮癌的機率是誘導程度低的基因型(hetero type 與 variant type)的 3.2 倍(OR = 3.20, 95% CI, 1.25-8.16)。當同

時考慮 CYP1A1 基因型與 GSTM1 基因型時，則發現酵素活性被誘導程度高的 variant CYP1A1 基因型且缺乏解毒酵素的 GSTM1 null 的人，在肺癌病人中之比例(12.9%) 比對照組(8.0%)高，不過在統計學上並不會顯著增加罹患肺癌危險性。

許多環境污染物與肺癌的發生有關，其中包括多環芳香烴類化合物，例如 benzo[a]pyrene (B[a]P)。多環芳香烴類化合物除了經 CYP1A1 代謝活化外，亦可以經由活化 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)與 AhR nuclear translocator (Arnt) 結合而誘導 CYP1A1 基因表現，此外 CYP1B1 與 NQO1 基因也會經由活化 AhR 而被多環芳香烴類所誘導，參與其代謝反應。A427 與 CL-3 為肺腺癌細胞株，二株細胞對 B[a]P 敏感性不同。A427 細胞之 CYP1A1 基因型為 wild type，CL-3 細胞為 hetero type。由前人的研究已知 wild type 與 hetero type CYP1A1 被誘導的程度相同，接著我們利用半定量 RT-PCR (Semi-quantitative Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction) 的技術來看 B[a]P 在這二株細胞中誘導基因表現的能力。結果發現 1 或 10 μ M B[a]P 處理 24 小時後，可以增加 CL-3 細胞 CYP1A1 與 CYP1B1 基因表現 3 倍，而 A427 細胞基因表現卻不受影響，二細胞株 NQO1 基因表現均不受 B[a]P 影響，此外 A427 與 CL-3 皆具有 AhR 與 Arnt 基因表現。

綜合以上的研究結果，發現在抽煙者中 wild-type NQO1 基因型罹患肺癌的機會是 NQO1 其他基因型的 3.66 倍，而 wild-type NQO1 基因型的抽煙者罹患肺腺癌的機會是其他基因型的 4.52 倍。Variant CYP1A1 基因型罹患肺鱗狀上皮癌的機會是 CYP1A1 其他基因型的 3.2 倍。在基因表現的

實驗中，B[a]P 會同時誘導 CL-3 細胞 CYP1A1 與 CYP1B1 基因表現增加，但是對 A427 細胞沒有影響，因此 B[a]P 誘導 A427 與 CL-3 細胞 CYP1A1 基因表現能力不同，並不能單用兩細胞株的 CYP1A1 基因型不同來解釋，可能有其他的因子影響 B[a]P 誘導 CYP1A1 的基因表現之作用，而改變細胞對 B[a]P 的敏感性。

Abstract

Many environmental carcinogens requiring metabolic activation have been associated with the development of lung cancer. Recent epidemiological studies demonstrated the association between genetic polymorphisms with lung cancer risk, including cytochrome P450 IA1 (CYPIA1), glutathione S-transferase M1(GSTM1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1). We conducted a case-control study to estimate the association of the CYPIA1, GSTM1 and NQO1 genetic polymorphisms with lung cancer. The genotype of these polymorphisms was determined by using RFLP analysis of PCR-amplified DNA. The enzyme inducibility in variant CYPIA1 genotype was higher than that in other genotypes. GSTM1 null genotype results in gene deletion and loses of enzyme activity. Wild NQO1 genotype has higher enzyme activity than other genotypes. When controls and cases were stratified according to smoking status, the odds ratio (OR) for smokers was 3.66 after adjustment for age and sex [95% confidence interval (CI), 1.03-13.6]. The OR for adenocarcinoma risk among smokers with wild-type NQO1 increased to 4.52 (95%CI, 1.69-12.13), after adjustment for age and sex. Multivariate logistic analysis indicated an association with genetic variant of CYPIA1 polymorphism in squamous cell carcinoma, after adjustment for age, sex and smoking status (OR=3.2, 95%CI, 1.25-8.16). The proportion of lung cancer patients with variant CYPIA1 genotype combining with deficient GSTM1 were higher (12.9%) than non-lung cancer control (8.0%), although no statistical significance was found.

Exposure to polyaromatic hydrocarbons (PAHs), such as benzo[a]pyrene (B[a]P), is associated with lung cancer. PAHs are not only metabolically activated by CYP1A1, but also induce CYP1A1 gene expression through activation of AhR-Arnt complex. PAHs also induce CYP1B1 and NQO1 gene expression by the same mechanism. Two lung adenocarcinoma cells, A427 and CL-3, have different sensitivity to B[a]P. The genotype was different between A427 and CL-3 cell lines. CYP1A1 Msp1 polymorphism in A427 and CL-3 cells were respectively wild and hetero type. It was demonstrated that CYP1A1 inducibility was similar in wild and hetero types. Therefore we examined the effect of B[a]P on gene expression in A427 and CL-3 cells. In A427 and CL-3, cells mRNA levels of CYP1A1, CYP1B1, NQO1, AhR and Arnt were measured by semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction. B[a]P induced 3 fold of CYP1A1 and CYP1B1 gene expression in CL-3 cell after treatment with 1 or 10 μ M B[a]P for 24 hours. However, mRNA levels of these genes remained the same in A427 cell. B[a]P did not change NQO1 mRNA levels in both CL-3 and A427 cells. We found that mRNA of AhR and Arnt existed in both A427 and CL-3 cells.

These data indicated that wild-type NQO1 genotype increased the lung cancer risk among smokers (OR = 3.66), and among smokers with adenocarcinoma (OR = 4.52). Individuals with variant CYP1A1 genotype were at high risk of squamous cell carcinoma after adjustment for age, sex and smoking status (OR = 3.2, 95% CI, 1.25-8.16). B[a]P increased mRNA levels

of CYP1A1 and CYP1B1 in CL-3 cell instead of A427 cell. Therefore, in addition to genetic polymorphism of CYP1A1, other mechanisms may influence B[a]P-induced CYP1A1 gene expression in lung adenocarcinoma cells.

第一章 前言

第一節 肺癌流行病學特徵

臺灣的癌症登記系統，衛生署自 1979 年才開始進行。肺癌的男、女年齡標準化每十萬人口死亡率，從 1955 年的 2.67、1.25 人增加到 1991 年的 25.42、10.85 人。在十八個國家男性排行第十七名，女性排行第九名。性比例約保持在 1.6-2.1，三十年來沒有太大的改變，是世界最低的地區(Yang et al, 1984; 陸坤泰與張登斌, 1992; Tay et al, 1988; Lun et al, 1974)。三十年來，男女性肺癌幾乎都增加八倍，是世界上增加最快的地區。和其他癌症比較，也是增加率最快的癌症。目前臺灣的癌症死亡率，男性僅次於肝癌；女性則已超過子宮頸癌，排行第一(Yang et al, 1984; 陸坤泰與張登斌, 1992)。腺癌佔所有肺癌的比例，三十年來始終高居第一。尤其在女性非吸煙者，有更高比例的腺癌患者(Yang et al, 1984; 陸坤泰與張登斌, 1992)。在同為華人的地區，有相似的性比例及好發腺癌的特徵。而發生率方面，則以新加坡最高，香港次之(Tay et al, 1988)。在男性 79% 的肺癌可歸因於吸煙，但女性只有 15% 的肺癌可歸因於吸煙(陸坤泰與張登斌, 1992)。女性吸煙的比例在一般族群只有 3%。城市和鄉村地區吸煙比例相似，但肺癌發生率卻相差四倍；山胞吸煙的比例比平地還高，但肺癌的發生率相當低(Tay et al, 1988); 再加上性比例偏低，及組織型態以腺癌偏多，這些證據都顯示：雖然香煙是一個重要因子，但在臺灣應該還有另外重要的因子有待發現(Yang et al, 1984; 陸坤泰與張登斌, 1992; Tay et al, 1988; Lee et al 1994; 蕭光明, 1992)。

第二節 肺癌的危險因子

肺癌的發生已被證實或懷疑的危險因子有：(1)吸煙 (2)職業暴露 (3)放射線物質 (4)空氣污染 (5)營養因素 (6)遺傳易罹癌性 (7)其他危險因子，分述如下

(1) 吸煙

最早有關於香煙危害之報告，可能是 1761 年，Dr. Hill 對兩名因吸鼻煙而罹患鼻癌的病例之研究(Redmond, 1761)。香煙和肺癌有明顯的劑量效應關係，吸煙者發生肺癌的相對危險性是不吸煙者的 10 倍左右，而重度吸煙者的相對危險性更高達 15-25 倍左右(US Public Health Service, 1982)。危險性會隨著吸煙的年數、每天吸煙量、吸入的深度、焦油含量的增加而增加(International Agency for Research on Cancer, 1986)。Doll 和 Peto 曾根據多步驟致病模式導出肺癌發生之相對危險性和吸煙年數的 4.5 次方、吸煙量的二次方成正比(Doll and Peto, 1987)。在大多數的國家中，80% 以上的肺癌可歸因於香煙(Christensen et al, 1987)，戒煙約十六年後，危險性也無法恢復到正常的水準(Chan et al, 1993)。

(2) 職業暴露

石綿是纖維狀的矽酸鹽結晶，具有多種的工業用途。長久以來，人們知道採礦或製造石綿會使人得到塵肺症。1940 年代，開始有人懷疑石綿和肺癌的關係。最初是發現在加拿大安大略省(Outario)因矽肺沉著而接受補

償的病人，似乎有較高的危險性得到肺癌(Finkelstein et al, 1982)。石綿造成肺癌的相對危險性大約為五倍，而且和吸煙具有加成的作用；若同時又吸煙，則危險性可達 50 倍(Selikoff et al, 1968)。有關砷和肺癌的關係，陳等人在台灣烏腳病盛行地區做過一系列的研究(Chiou et al, 1995; Chen et al, 1988, Horng et al, 1995)，發現慢性砷暴露會導致肺癌發生率之提高，而且和吸煙具有加成之作用。另外芥子氣(Easton et al, 1988)、鉻(International Agency for Research on Cancer, 1990)、鎳(International Agency for Research on Cancer, 1990)、鎘(Doll, 1982)、矽(International Agency for Research on Cancer, 1987)、甲醛(International Agency for Research on Cancer, 1995)、多環芳香烴(International Agency for Research on Cancer, 1988)也都有報告會增加肺癌的發生率。

(3) 放射線物質

和肺癌最有關係的游離性輻射是氡氣的暴露(International Agency for Research on Cancer, 1988)。鈾礦工人有較高的肺癌發生率，據信和礦坑內的氡氣及其衰變物有關。目前流病的研究針對居家氡氣暴露和肺癌之關係，多顯示微弱或無相關(International Agency for Research on Cancer, 1988; Axelson et al, 1988)。而居家之氡氣之暴露之危害之計算，多由礦坑中高劑量輻射之危害利用外差法來估算低劑量之危害。而此估算常會隨著假設及模式之不同而有很大之差異(Axelson et al, 1988)。

(4) 空氣污染

隨著工業化、都市化之進展，肺癌發生率急速上昇。在台灣城鄉肺癌發

生率差異達四倍，而吸煙率並無顯著差異，空氣污染之影響可能無法排除。而台灣空氣污染的型態和國外有所不同，機車污染佔相當重要之角色。因為機車燃料燃燒溫度較低，所以致癌物含量較高。蕭等人也作過生態相關的研究(蕭光明, 1992)，利用 1969-1980 年間，台灣個縣市平均的懸浮微粒落塵量及煤煙濃度和 1989 年各縣市之肺癌死亡率作相關性研究。結果並無統計顯著相關之存在。

(5) 營養因素

長久以來大家都已經知道維生素 A 具有協調細胞分化的生理角色。而去分化既然是癌症細胞一個重要的特徵，那麼維生素 A 也很可能在致癌過程扮演著特殊之角色。自然界中有兩種主要的維生素 A：視黃醇(retinol)只來自於動物性食品，而 β -胡蘿蔔素大多數來自植物性物質。許多研究(Nomura et al, 1985; Willet et al, 1985, Menkes et al, 1986; Pastorino et al, 1987; Salonen et al., 1985; Kune et al, 1989)利用重疊病例對照法或病例對照研究及血清指標來看維生素 A 和肺癌之關係。在 β -胡蘿蔔素組，通常得到的結論都是一致且具保護作用。而視黃醇組，因為血清中視黃醇並不是測定飲食攝取量一個很好的指標，所以在絕大多數的研究都看不到相關。

(6) 遺傳易罹癌性

癌症的形成過程都是環境及遺傳的交互作用，大多數癌症之發展(80-90%)，都經過嗜電子之活化物質和 DNA 形成鍵結物，導致致癌基因活化、抑癌基因之抑制、或染色體之不穩定最終形成癌症。已知和癌症較有關



的酵素多態型有三：乙醯化(acetylation)、異奎呱(debrisoquine) 4-烴化(hydroxylation)、芳香碳氫化合物(aromatic hydrocarbon)烴化(hydroxylation) (Pastorino et al, 1987)。後兩者和肺癌有關，而第一個和膀胱癌、大腸直腸癌有關。日本的研究者發現細胞色素 P450 酵素IA1 基因(cytochrome P450IA1) MSP1 多型態和肺鱗狀細胞癌有關，但和肺腺癌關係不顯著 (Shields et al, 1992; Nakachi et al, 1991; Nakachi et al, 1990)。麩胺硫轉移酵素 M1(GSTM1)缺陷型也會增加肺癌的危險性，而這兩種基因的多型態呈加成反應(Alexandrie et al, 1994; kawajiri et al, 1993; Nakachi et al, 1993)。

(7) 其他危險因子

有人認為烹調用油和肺癌有關。這可以部份解釋為何中國婦女很少吸煙，卻好發腺癌。在中國大陸上海的研究發現(Gao et al, 1987)：肺癌和烹調的方式(煎、炒、煮)，烹調的餐數，烹調時的油煙大小，烹調用油，尤其是油菜子油(rapeseed oil)都有相關。另外對烹調油煙的分析中發現其中含有致癌物的成分(Li, 1994)，這些證據都可部份支持此假說。荷爾蒙也是另一個值得注意的因子，因為有人發現在肺腺癌組織周圍可以發現荷爾蒙受器(Chaudhuri et al, 1982)。另外有人發現月經週期較短的女性比月經週期較長的女性得肺癌的危險性較高(Gao et al, 1987)。而在非吸煙的族群中，女性發生肺癌的比例比男性高。這些證據顯示荷爾蒙在肺癌的致病機轉上的確扮演著某種角色。

第三節 NQO1 酵素功能及與肺癌的關係

NAD(P)H quinone oxidoreductase(NQO1) (又稱 DT-diaphorase EC1, 6, 99, 2), 含有 FAD 雙聚體(dimeric flavin adenine dinucleotide)的蛋白, 位於細胞質內主要活性為催化 quinone 類化合物 2 個電子還原(Li, et al, 1995; Cadenase, 1995), 將 quinone 還原成較穩定 hydroquinone, 避免產生 free radical 與 reactive oxygen species, 因此可以保護細胞免於氧化性傷害(Cadenase, 1995; Joseph and Jaiswal, 1994), 例如 B[a]P。然而 NQO1 酵素也可以將某些化合物還原而活化, 轉變成毒性較高之代謝物, 如化學治療藥物: EO9, mitomycin C 與環境中致癌物: nitroaromatic compounds (dinitropyrenes), heterocyclicamines (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline), 3-amino-1-methyl-5(-)-pyrido[4,3-b] indole。

Traver 等人(1992)比較 10 種 colon carcinoma cell lines 的 NQO1 基因表現與酵素活性之關係, 結果發現 BE cell exon 6 上第 609 base pair 因 C to T 鹼基置換後(substitution), 胺基酸由 proline 變成 serine, 會降低 NQO1 酵素活性。之後作者又分別將 wild type 基因與 mutant 基因送入 E. coli 中發現 mutant 基因的 NQO1 蛋白量只有 wild-type 的 2% (Traver, et al, 1997)。已有研究指出在肺部 tumor tissue NQO1 基因表現高於非 tumor tissue (Belinsky and Jaiswal, 1993)。Wiencke 等人(1997)針對 2 個不同的族群進行 case control study 探討 NQO1 基因型與肺癌的關係。在 Mexican-American 中, 肺癌病人與對照組 wild type NQO1 分別是 48% 與 32%。而在 African-Americans 中肺癌病人與對照組 wild type NQO1 分別是 66% 與 61%。不分種族時, 在全部肺癌病人中 wild type NQO1 比對照組高(60% vs. 46%), 同時控制年齡、性別、種族與抽煙情況後, 經多變項邏輯式迴歸分析顯示, wild-type NQO1 罹患肺癌的機會是其他基因型的 1.8 倍(95

% CI, 1.09-2.97)。在不同種族間，NQO1 基因多型態的分佈也不同，在對照組中 African-American wild type NQO1 61%，而 Mexican-American wild type NQO1 只有 32%。

因此，本研究的目的是在探討 wild type NQO1 基因型(NQO1 酵素活性高)與肺癌的關係。

第四節 CYP1A1 酵素功能及與肺癌的關係

在人類的肺臟中 p450 酵素 主要分佈於肺支氣管上皮細胞，肺泡 type II 細胞及肺泡巨噬細胞內，屬於 phase I 酵素，可以將前致癌物氧化成親電子的中間產物，例如，PAH 類化合物經 CYP1A1 酵素代謝氧化成 phenolic 結構與 epoxides 結構。CYP1A1 除了代謝活化 PAH 外，CYP1A1 酵素活性亦可被 PAH 化合物誘導。已有研究指出 PAH 對 mice 的致癌性與 CYP1A1 被誘導的能力有關(Nebert and Tones, 1989)。除了 PAH 外，CYP1A1 仍可被 TCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), flavones, indole 衍生物所誘導，在 mice 的實驗中，具誘導能力的化合物藉著和 Aryl hydrocarbon receptor(AhR)結合而誘導 CYP1A1。CYP1A1 基因多型態會影響酵素活性，而 CYP1A1 基因多型態主要的研究有二個：一是 3'-flanking region 上第 250 個 base pair 由 C 突變成 T 會產生 *MspI* 酵素切點。另一是在 exon 7 上第 462 個胺基酸由 isoleucine 變成 valine。而有研究指出 CYP1A1 *MspI* 基因多型態與 AHH 被誘導的能力有關。Kiyohara 等人針對日本 Fukuoka 地區 84 個健康的志願者分離出週邊血液淋巴球，處理 3-

methylcholanthrene (3-MC)後發現，*MspI* mutant 的細胞 AHH 被誘導的程度是其他基因型的 3 倍(Kiyohara et al, 1996)。而 Landi MT 等人(1994)分析暴露於 TCDD 的 Caucasian 人中 *MspI* 之基因多型態與培養的淋巴球中 CYP1A1 mRNA 表現，EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase)活性的相關性發現 CYP1A1 mRNA 表現與基因型在統計上沒有顯著的相關性(Landi et al, 1994)。

Liu and Wag (1988)的研究指出在控制年齡、性別、抽煙、生活情況、職業暴露及疾病史後，肺癌病人的肺組織中 AHH/GST 酵素活性的比值顯著高於非肺癌的病人。日本的研究結果也指出在不抽煙的人中肺癌病人肺組織中 AHH 活性高於非肺癌病人(Yoshikawa et al, 1994)。

Kawajiri 等人(1990)對日本肺癌病人進行 case-control study，指出肺癌病人中 *MspI* polymorphism homozygous rare allele (genotype C)對偶基因頻率是對照組的 3 倍(23% vs. 10.6%)。這是首次發表 CYP1A1 *MspI* 基因多型態與肺癌有相關的研究。基因多型態與肺癌的關係，因種族不同而有差異。Kawajiri 等人的研究指出肺癌病人與正常對照組 genotype C 頻率分別是 21.2 %與 10.6 %，作者認為 genotype C 會增加患 kreyberg I type (Squamous 與 undifferentiated 未分化的 cell carcinoma)肺癌的危險性。Nakaclin 等人在 case-control 研究中指出在抽煙量低的人 genotype C 罹患 squamous cell carcinoma 的危險性是其他基因型的 7.3 倍。Xu, Kelsey. T., 指出在 Cascasians 中 genotype B 與 genotype C 會增加罹患肺癌的危險性。但是在西方國家如 Finland, Germany, USA 等的研究卻認為 *MspI* 基因多型態與肺癌沒有顯著相關性。

因此，本研究的目的是在探討 CYP1A1 基因多型態與肺癌的關係。

第五節 GST 酵素功能及與肺癌的關係

Glutathione S-transferases (GST)，依基因的差異可以分成 4 類： α 、 θ 、 μ 與 π 。而 GST 酵素的主要功能便是將“親電子的外來物”(electrophilic xenobiotics) 與 glutathione (GSH) 共價鍵結，如 7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) 與 aflatoxin B₁ epoxide (Mannervik and Danielson, 1998) 經 GST 作用而與 GSH 共價鍵結，鍵結後的複合物更具極性而易於排出體外。

GSTM1 null allele 由於部份基因或整段基因缺失(deletion)而產生不具有催化活性的酵素(Seidegard et al, 1988)。另有研究指出 GST M1* O (null allele) 與缺乏 GSTM1 null 的表現型有密切關係(Widersten et al, 1991; Daly et al, 1994; Wilson et al, 1989)。

根據日本、歐洲、北美等許多國家的研究報告指出，約 40~50% 的人缺乏 GSTM1 酵素活性，而肺癌的人缺乏 GSTM1 酵素活性的比例增高。如 Seidegard 等人(1990)與 Heclbert 等人(1992)測血液淋巴球中 GSTM1 TSO 活性 (trans-stilbene oxide activity, specific to M1)，發現在肺癌病人中 GSTM1 TSO activity (37%) 比非癌症對照組 (42-58%) 低。在肺組織，肺癌病人具 GSTM1 TSO 活性的比例亦比非癌症對照組低(Nazar-Stewart, et al, 1993)。因此在肺癌病人似乎有更高比例的人缺乏 GSTM1 酵素活性。Soni(1995)在 Indian 族群亦發現在與抽煙有關的疾病中。抽煙者血液中淋巴球 GSTM1 TSO 活性較低 (OR = 3.7, 95%CI, 1.6~8.5)。

GSTM1 null 基因型在腫瘤與非腫瘤組織都有較高的 PAH-DNA adduct，而在人類肺組織，一般相信 GSTM1 null 與 PAH-DNA adduct 的量呈現負相關(Ketterer, et al, 1992)。而 GSTM1 null 基因型與肺癌有正相關。McWilliams (1995)以 12 個 case-control 共 1593 肺癌病人與 2135 對照組肺癌病人中 GSTM1 null 基因型約 17%，GSTM1 null 與肺癌有顯著相關(OR=1.41, 95%CI=1.23-1.01, p<0.001)。而另一中國族群的研究指出在肺癌病人 71%為 GST mu 缺乏，而對照組基因缺失的頻率為 51.1%，統計上具顯差異(p<0.005)(Sun, et al, 1997)。日本 Kihara 等人的研究也指出在肺癌病人的 GSTM1 null 基因型(55.9%)與非肺癌對照組(55.9%)與非肺癌對照組(49.6%)有顯著差異(Kihara, et al, 1995)。

因此，本研究的目的是在探討 GSTM1 基因缺失與肺癌的影響。

第六節 B[a]P 與肺癌的關係

空氣煙霧懸浮微粒的致突變性，可能與肺癌的死亡率有關(Iwagawa et al., 1989)。煙霧懸浮微粒中的主要污染物是多環芳香烴類化合物(PAHs)，特別是 benzo[a]pyrene (B[a]P) (Petry et al., 1995)。多環芳香烴 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)是一種廣泛分佈於環境之中的污染物，它的種類相當多，通常是經由有機物不完全燃燒所產生。來源包括香煙煙霧懸浮微粒、汽車、運輸貨車、飛機、機車及割草機引擎所排放的廢氣(Venier et al., 1985; Masclet et al., 1986)；發電廠石化燃料以及焚化爐中廢棄物的高溫燃燒；家庭用的瓦斯加熱器、煤油加熱器等燃燒也會產生多環芳香烴類化合物；以及鎔鍊場、鑄造工廠以及電鍍工廠等所排放之污染物

(Hazardous Substances Data Bank, 1988; Lee et al., 1994)，也都是空氣中多環芳香烴之主要來源。除此之外，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也都含有多環芳香烴類，如 B[a]P、dibenzo(a,h)anthracene (DbahA) (Li et al., 1994)。香煙中亦含有高量多環芳香烴類，如 B[a]P、benzo[g, h, i]perylene 與 benzo[b]fluoranthene (Hanspeter et al, 1997)。人類肺癌的發生通常與暴露於前致癌物 (procarcinogens)有關，而這些前致癌物主要存於香煙中，而許多芳香類化合物(polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH)，例如 B[a]P，在動物實驗中已經證實 B[a]P 為致癌物(Nebert, 1989)。Hecht 等人(1994)之研究中發現，於鼯鼠注射 24 μ mole B[a]P，九週後會誘導鼯鼠肺臟形成腫瘤。Iwagawa 等人(1989)研究發現注射 0.3-1.0 mg B[a]P 後，大鼠肺癌發生率與給予的時間有正相關性。Wolterbeek 等人(1993)研究中指出在直接以導管將 B[a]P 灌入中國倉鼠氣管中，結果發現在老鼠氣管會形成 B[a]P 與 DNA 的鍵結物。Sohodet 等人(1989)研究指出，將柴油引擎排放物處理人類淋巴球細胞，結果發現可形成五種 DNA 鍵結物，而其中最主要的 DNA 鍵結物為 B[a]P-DNA 鍵結物。Nesnow 等人(1993)研究指出人類淋巴球經 B[a]P 處理後，形成 DNA 鍵結物，而且 DNA 鍵結物形成與 B[a]P 之劑量及暴露時間有關。Binkova 等人(1995)的研究指出，血液中 DNA 鍵結物的量可以反應短期的 PAH 環境暴露，在不抽煙的女性中，曝露 PAH 的量與血液中 DNA 鍵結物的量在統計上有顯著相關($r = 0.541, p < 0.016$)，而且在不抽煙的女性中，PAH 暴露量高的其血液中 DNA 鍵結物的量也較高($p < 0.05$)。

Harris 等人(1991)研究中指出 B[a]P 會造成 *ras* 原致癌基因

(protooncogene) 之第 12 密碼(coden)發生 G→T 的 transversion ; 而 Cherpillod 等人 1995 研究中指出 B[a]P 會造成 *p53* 抑癌基因之第 248 及 249 密碼位置發生 G→T 的 transversion , 這些研究結果都更加印證 B[a]P 確實會造成人類或動物體的基因發生突變 , 甚至可造成癌症的發生。

第七節 Benzo[a]pyrene 誘導基因表現之能力

B[a]P 主要是經由 Cytochrome P450IA1 酵素代謝活化成(-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene , 然後再繼續氧化成 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (BPDE) 最終代謝物 , 可與 DNA 鍵結的致突變或致癌型結構物 (Shimada et al, 1992) 。然而 B[a]P 經代謝活化後的代謝物 , 可以經由 GSTM1 酵素代謝解毒(Mannervik et al, 1988) 。B[a]P 亦可以經由與細胞質內活化的 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 結合後 , 再和 Ah receptor nuclear translocator (Arnt) 鍵結形成複合物 , 誘導基因表現 , 例如 CYP1A1 、CYP1B1 與 NQO1 等代謝藥物之酵素基因。

Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性 , 代表 CYP1A1 酵素將 PAH 類化合物轉變成與 DNA 鍵結型的能力(Jeffrey et al, 1977; Karki et al, 1987) 。而 AHH 活性可以被抽煙所誘導 , 抽煙的人其肺巨噬細胞中 AHH 活性是不抽煙者的 11 倍 (Wheeler and Guenther, 1991; Cantrell et al, 1973) , 當停止抽煙後 , 在 60 天內肺壁中 AHH 活性會回復至正常值 (Amos et al, 1992; Fujii-Kuriyama et al, 1995; Miller and Miller, 1981) 。經由北方墨點法結果顯示 , 在戒煙後二星期 , 肺組織中 CYP1A1 mRNA 開始減少 ,

一直到戒煙後六星期由北方墨點法無法偵測到 CYP1A1 mRNA(Miller and Miller, 1981)。有許多研究指出 AHH 活性與罹患肺癌有關，早期 Kellerman 等人利用 3-methylcholanthrene 誘導週邊血液淋巴球中 AHH 活性，在肺癌病人有 30%的人高度誘導 AHH 活性，而正常的對照組只有 9%。然而在肺癌病人的非肺組織中，AHH 被誘導的程度與一般人沒有差別，因此結果顯示，AHH 活性被誘導的程度與肺癌有關 (Kellerman et al, 1973)。在動物實驗中更證實了，AHH 被誘導的能力越高，則經由 PAH 引發肺腫瘤的敏感性也越高 (Kouri et al, 1980; Kouri et al, 1984)。除了 CYP1A1 外，多環芳香類化合物(PAH)亦會誘導 CYP1B1 與 NQO1。

多環芳香類化合物除了由 CYP1A1 代謝活化外，人類 CYP1B1 亦參與多環芳香類化合物、arylamines 等 procarcinogen 與 promutagenes 的代謝與活化(Shimada, et al, 1996)，CYP1B1 mRNA 主要分佈於肝外組織，如：淋巴球、子宮內膜、支氣管灌洗液細胞及胎盤 (Hakkola, 1997)。人類 CYP1B1 基因的 promoter 含有 TCDD-responsive enhancer core binding motifs，可被 TCDD(戴奧辛)所誘導(Tang et al, 1996)，雖然 CYP1B1 表現可經由 AhR 調控(Hakkola, 1997)，但是在某些細胞中經 TCDD 誘導後，CYP1B1 基因表現的調控卻具有細胞特異性(Kress, 1997)，並不是每個細胞在處理 TCDD 後都會經由 AhR 同時調控 CYP1A1 與 CYP1B1 基因表現。同時有研究指出，在 Hep G2 細胞中 NQO1 基因 promoter 含有 XRE (Xenobiotic responsive element)，經 TCDD 處理後可以增加 3 倍 NQO1 轉錄速度(Jaiswal, 1996)，TCDD 誘導 NQO1 酵素活性增加 5 倍(Tang et al, 1996)。

第七節 研究目的

- 一、利用 case-control study，探討台灣肺癌病人中 Cytochrome P450IA1、Glutathione S-transferase M1 及 NAD(P)H：quinone oxidoreductase 遺傳基因多型態與肺癌的關係。
- 二、利用二株對 Benzo[a]pyrene 敏感性不同的肺癌細胞株，比較 Cytochrome P450IA1、Glutathione S-transferase M1 及 NAD(P)H：quinone oxidoreductase 基因型，與 Benzo[a]pyrene 誘導基因表現的差異。

第二章 材料與方法

第一節 材料

一、藥品

QIAamp Blood Kit 購自德國 QIAGEN 公司。 ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA)、isoamyl alcohol、sodium acetate、ethidium bromide、dimethyl sulfoxide (DMSO)、benzo[a]pyrene (B[a]P)、guanidinium thiocyanate (GTC)、sodium citrate、sarcosyl、 β -mercaptoethanol、sodium acetate、DNase、 $MgCl_2$ 、dithiothreitol(DTT)、didecyl sulfate sodium (SDS) 購自美國 Sigma 公司。 NaCl、Tris、 $NaHCO_3$ 、KCl、 KH_3PO_4 、 NaH_2PO_4 購自德國 Merck 公司。 primer、dNTP、MMLV Reverse transcriptase (SuperScriptTMII)、proteinase K、Fetal bovine serum(FBS)、L-glutamin、penicilline/streptomycin、F-12 medium、sodium pyruvate、non-essential amino acid (NEAA)和 basal medium eagle (BME) medium 購自美國 Gibco-BRL 公司。 phenol、chloroform、agarose 購自 Amesco 公司。 ethanol 購自日本和光公司。 Taq (DyNAzymeTM II, Finland)、MspI、HinfI 酵素、Oligo(dT)₁₂ 購自美國 NEB 公司。 培養皿購自丹麥 Nunc 公司。 ribonuclease inhibitor 購自 PharmaciaBiotech 公司。

二、檢體來源

肺癌病人正常肺組織由台中榮總胸腔外科陳志毅醫師提供，所有組織都是經由外科手術取下位於腫瘤週邊的組織，並經過病理檢驗確定為正常之肺組織；對照組血液由中山醫學院附設醫院檢驗科提供，對照組是篩選門診抽血病人中沒有癌症疾病歷史，且其家人亦沒有罹患癌症的歷史個案，除抽血 2-5 ml 外並進行問卷調查記錄性別、年齡、抽煙劑量.....等。對照組人數共 190 人，肺癌病人共 114 人，其中包括 adenocarcinoma 56 人，squamous carcinoma 48 人，其他病歷 10 人(adenocarcinoma & large cell carcinoma 1 人，adenocarcinoma & small cell carcinoma 1 人，adenocarcinoma & squamous carcinoma 1 人，large cell carcinoma 2 人，metastasis 3 人，small cell carcinoma 2 人)。在進行基因多型態分析時，有些樣品無法進行反應，所以各部份人數略有差異，會在各部份結果中敘述總人數。抽煙的人包含至採血日止持續抽煙或戒煙未滿一年，戒煙一年以上的人數太少故不納入本研究中，而不抽煙的人包含至採血日止沒有主動抽煙的習慣，人數分佈見附表一。

三、細胞來源

CL-3 細胞株是臺大醫院楊泮池醫師殖株培養成功之人類肺腺癌細胞株，本實驗室所欲使用之 CL-3 即由楊醫師處獲得；A427 細胞是美國人類肺腺癌細胞株，購自美國 American Type Culture Collection (ATCC) 公司。

四、食用油煙霧製備方式

精製油、大豆油、蔬菜油共 0.2L，在鐵鍋內以 $265 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 加熱，同時在油液面上 20~30 公分用抽風機以速度 13~15 L/min 抽氣收集氣體於玻璃纖維濾紙上，共抽氣 2~4 小時。接著用 acetone 將吸附於玻璃纖維濾紙上煙霧顆粒溶出，蒸發濃縮後成黃色黏稠溶液(Li et al, 1994)。

附表一. 肺癌個案與對照組之抽煙者分佈

	人數	不抽煙者(%)	抽煙者(%)
NQO1 基因多型性分析			
全部個案	190	137(72.1)	53 (27.9)
男性	90	41 (46.7)	48 (53.3)
女性	100	95 (95.0)	5 (5.0)
肺腺癌	56	30 (53.6)	26 (46.4)
男性	40	14 (35.0)	26 (65.0)
女性	16	16 (100.0)	0 (0.0)
肺鱗狀上皮癌	48	9 (18.8)	39 (81.2)
男性	41	3 (7.3)	38 (92.7)
女性	7	6 (85.7)	1 (14.3)
其他	10	3(30.0)	7 (70.0)
男性	8	1 (12.5)	7 (87.5)
女性	2	2 (100.0)	0 (0.0)
CYPIA1 與 GSTM1 基因多型性分析			
對照組	188	136 (72.3)	52 (27.7)
男性	88	41 (46.6)	47 (53.4)
女性	100	95 (95.0)	5 (5.0)
肺腺癌	52	28 (53.8)	24 (46.2)
男性	37	13 (35.1)	24 (64.9)
女性	15	15 (100.0)	0 (0.0)
肺鱗狀上皮癌	47	10 (21.3)	37 (78.7)
男性	40	4 (10.0)	36 (90.0)
女性	7	6 (85.7)	1 (14.3)
其他	10	3(30.0)	7 (70.0)
男性	8	1 (12.5)	7 (87.5)
女性	2	2 (100.0)	0 (0.0)

第二節 方法

一、細胞培養

CL-3 細胞以含有 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL) 0.22% NaHCO₃, 0.03% L-glutamin 和 penicilline/streptomycin (100U/ml) 之 F-12 medium (Gibco-BRL) 培養。A427 細胞則以含有 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL) 0.11% NaHCO₃, 0.03% L-glutamin, penicilline/streptomycin (100U/ml), 1 mM Sodium pyruvate 及 100 mM non-essential amino acid (NEAA) 之 basal medium eagle (BME) medium 培養。細胞置於 5% CO₂ 的 37°C 的恆溫培養箱內培養。

二、DNA 純化

1. 病人正常肺組織 DNA：肺組織以 standard phenol (Maniatis et al., 1982) 方法萃取 DNA。步驟如下：肺組織置於 eppendorf 管內加入 500 μ l digestion buffer (25 mM EDTA、100 mM NaCl、0.5% SDS 和 10 mM Tris)，於液態氮中迅速冷凍，再放入 45°C 的溫水中快速回溫，重複此步驟三至五次，使外圍結締組織變脆，再加入 5 μ l proteinase K (10 mg/ml) 在 56°C 培育數小時。以等體積 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, v/v/v) 混合液萃取，經混合均勻後以 10,000 g 離心 10 分鐘，取上清液後，再重覆同樣動作二次以完全去除蛋白。再加入等體積 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1, v/v) 混合液萃取，經混合均勻後以 10,000 g 離心 5 分鐘。取上清液加入 1/10 體積的 3 M sodium acetate 及 2 倍體積 100% cold ethanol 混合均勻，靜置於 -20

°C 冰箱中 2 小時。室溫下以 1,500 g 離心 5 分鐘，收集 DNA pellet 再以 70 % cold ethanol 洗去殘餘鹽類，離心留下 DNA pellet，待乾後溶於無菌水，以紫外線光譜儀定量 DNA，最後部份 DNA 以無菌水稀釋至 40 ng/μl，DNA 置 -20°C 保存。

2. 對照組血液 DNA：血液以 QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Germany) 抽取 DNA。步驟如下：血液以含 EDTA 抗凝劑的真空採血管收集後，離心並取出 buffy coat (主要含有淋巴球) 以 1x PBS (0.02% KCl、0.02% KH₂PO₄、0.8% NaCl、0.216% Na₂HPO₄) 補足體積至 200 μl，加入 25 μl QIAGEN protease、200 μl Buffer AL (lysis buffer) 振盪混合 15 秒，置 70°C 作用 10 分鐘後，加入 210 μl (96–100%) 酒精振盪混合後將全部液體移至 QIAamp spin column 上，經 6,000 g 離心 1 分鐘後 DNA 會附著於 QIAamp spin column 上，QIAamp spin column 接著以 500 μl Buffer AW (wash buffer) 洗 2 次，最後用 200 μl Buffer AE (elute buffer) 將 DNA 沖出。以紫外線光譜儀定量 DNA，最後取部份 DNA 以無菌水稀釋至 40 ng/μl，DNA 置 -20 °C 保存。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.6~1.9 之間，可以得到約 20-120 μg DNA。

三、RNA 純化

分別將 DMSO(solvent control)、B[a]P 1μM 或 B[a]P 10μM 加入 A427 與 CL-3 細胞培養液中培養 24 小時後以 AGPC method (Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction) 抽取 RNA (Chomczynski et al., 1987)。步驟如下：吸去 2 盤 10 cm 培養皿中舊的培養液，以 1x PBS 洗二

次後，一盤細胞加入 1.8 ml solution D [4 M guanidinium thiocyanate、25 mM sodium citrate (pH = 7)、0.5% sarcosyl、0.1 M β -mercaptoethanol]，反覆以 solution D 沖洗細胞，待成黏稠狀態後到顯微鏡下觀察細胞是否完全 lyse，待細胞完全 lyse 後移到 15 ml 離心管，接著再加入下列溶液：360 μ l 的 2 M sodium acetate (pH = 4)(0.1 倍體積)、3.6 ml 的 phenol (1 倍體積)與 720 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol = 49 : 1(v/v) (0.2 倍體積)，充分混合均勻後置於冰上 15 分鐘，於 4°C 下 2,500 rpm 離心 20 分鐘或 10,000g 離心 20min 後 RNA 在上層 (aqueous phase)，取出上層液體加入等體積 100% isopropanol 置入-20°C 冰箱 1 小時沉澱 RNA，接著以 10,000g 離心 20 分鐘，再將 RNA pellet 溶於 0.5 ml solution D，移到 1.5 ml eppendorf，再加入等體積 100% isopropanol 置入-20°C 冰箱 1 小時沉澱 RNA，離心後 RNA pellet 以 75% cold ethanol 洗去殘餘鹽類。

為了避免 DNA 污染必須再用 DNase 處理，RNA 溶於 200 μ l 1x TE buffer (10mM Tris-Cl、1mM EDTA)與等體積 DNase working solution 混合 [20 mM $MgCl_2$ /2 mM DTT、0.4 μ l of ribonuclease inhibitor (20 - 25U/ μ l)和 2 μ g DNase，以 1x TE buffer 將體積補至 200 μ l]，於 37°C 水浴 15 分鐘。加入 100 μ l DNase stop solution (50 mM EDTA, 1.5 mM sodium acetate, 1% SDS) 終止 DNase 反應後先以 50 μ l 的 2 M sodium acetate (pH = 4)、500 μ l 的 phenol、100 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol (49:1,v/v)混合液萃取，接著以 600 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol (49:1,v/v)萃取後上清液，再以 等體積 100% isopropanol 於-20°C 1 小時沉澱 RNA，離心後 RNA pellet 以 75% cold ethanol 洗去殘餘鹽類，最後將 RNA 溶於 1x TE 即可。必須注意的是所有與 RNA 有關的試劑必須用 DEPC water (0.1% DEPC 在室溫中攪拌至完全

混合以破壞 RNase 後，再經溼熱高壓滅菌除去 DEPC) 所有的器皿、用具都必須滅菌。

四、製備互補 DNA (cDNA)

混合 20 ug 的 total RNA、2 ng 的 oligo(dT)₁₂ 及 DEPC 處理過的無菌水共 24 μ l，先加熱 70°C 10 分鐘破壞 RNA 二級結構後，立即置於冰上，接著加入 14 μ l 緩衝溶液 [50 mM Tris-HCl (pH=8.3)、75 mM KCl、3 mM Mg₂Cl、5 mM DTT、5 mM dNTP] 在 42°C 先加熱 2 分鐘再加入 400 U MMLV Reverse transcriptase (SuperScript™II, GIBCO)，接著在 42°C 反應 50 分鐘將 mRNA 反轉錄成 cDNA，最後再以 70°C 加熱 15 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 cDNA 保存於 -20°C。

五、聚合酵素連鎖反應及限制片段長度多型性(polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism)

聚合酵素連鎖反應以 120 ng DNA 當模版，在總反應體積為 30 μ l 的 1x 緩衝溶液中 [10 mM Tris-HCl (pH=8.8)、1.5 mM Mg Cl₂、50 mM KCl、0.1% Triton X-100]，加入特定的 primer 0.2 μ M (primer sequence 如附表二)、0.2 mM dNTP (GIBCO-BRL, USA) 和 0.6 Unit Taq (DyNAzyme™ II, Finland)，使用 UNO (Biometra) 熱循環儀將基因放大，反應條件如附表三。

取出 12 μ l 上述 PCR 產物以 10 Unit restriction enzyme (見附表二) (New

England Biolabs, Beverly, MA) 在 1x 緩衝溶液中 [50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、1mM DTT (pH=7.9)] 於 37°C 作用 4 小時。反應完成後取 10 μ l, 以 2.5% 洋菜膠 (agarose) 在 120 伏特電壓下進行電泳分析, 並放 0.5 μ g/ml ethidium bromide 在 running buffer 中染色, 電泳後置於 UV 箱上判讀。

附表二:

Genes	Primers	Polymorphism site	Restriction enzyme	Reference
CYP1A1	5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3' 5'-GGGGTTGATGAGTCTCCGACT-3'	3'-flanking region T ²⁵⁰ → C	<i>Msp</i> I	Hayashi et al, 1996
GST M1	5'-GAAGGTGGCCTCCTCCTTGG-3' 5'-AATTCTGGATTGTAGCAGAT-3'	Gene deletion		Groppi et al, 1991
NQO1	5'-TCCTCAGAGTGGCATT CAGC-3' 5'-TCTCCTCATCCTGTACCTCT-3'	exon 6 C ⁶⁰⁹ → T	<i>Hin</i> fl	Wiencke et al, 1997

附表三:

Gene	Thermocycle conditions		
	Initial denature →	35 cycles →	Further extention
CYP1A1	95°C - 3 min	95°C - 50 sec. 58°C - 50 sec. 72°C - 1 min	72°C - 7 min
GSTM1	95°C - 3 min	94°C - 40 sec. 58°C - 40 sec. 72°C - 40 sec.	72°C - 7 min
		5 cycles	
		94°C - 40 sec. 56°C - 40 sec. 72°C - 40 sec.	
		30 cycles	
NQO1	95°C - 3 min	95°C - 50 sec. 55°C - 50 sec. 72°C - 50 sec.	72°C - 7 min

六、半定量 RT-PCR (Semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction)

半定量 RT-PCR 主要是利用 c-DNA 為模版，以二對 primer (欲看的基因 & β -actin) 進行 multiple-PCR 反應。半定量 RT-PCR 混合 1 μ l cDNA (大約 0.5 μ g 的 total RNA)、0.22 μ M primer 1 (欲看的基因，primer 序列見附表四)、0.2 μ M β -actin primer、200 μ M dNTP (GIBCO-BRL, USA) 與 1 U Taq polymerase (DyNAzymeTM II, Finland) 於 1x 緩衝溶液中 [10 mM Tris-HCl (pH=8.8)、1.5 mM Mg Cl₂、50 mM KCl、0.1% Triton X-100]，總反應體積為 50 μ l。基因放大反應使用 MJ PTC-200 熱循環儀，反應溫度見附表五。

NQO1 與 CYP1B1 由於無法在同一 PCR 反應裡同時複製放大二段基因，因此每一樣品分別利用不同 primer 在相同的條件下進行基因複製放大。 β -actin 為 internal standard，其表現量不受影響。

定量方式：以 2% 洋菜膠並加入 0.5 μ g/ml ethidium bromide 於 running buffer 中電泳，再利用數位化影像分析系統 (AlphaImagerTM 200, Alpha Innotech corporation) 在 UV 燈下依據染色強度定量。計算公式以 1 μ M B[a]P 對 CYP1A1 mRNA 影響為例：

$$\frac{\text{處理 B[a]P } 1\mu\text{M} - \text{CYP1A1 定量值}}{\text{處理 B[a]P } 1\mu\text{M} - \beta\text{-actin 定量值}}$$

$$\frac{\text{處理 DMSO} - \text{CYP1A1 定量值}}{\text{處理 DMSO} - \beta\text{-actin 定量值}}$$

附表四

Gene	Primer	Reference:
AhR	5'-ATACTGAAGCAGAGCTGTGC -3' 5'-AAAGCAGGCGTGCATTAGAC -3'	Hayashi et al, 1994
Arnt	5'-* <u>CACTTGGGATCC</u> *CGGAACAAGATGACAGCCTAC-3' 5'-* <u>CACTTGGTCGAC</u> *ACAGAAAGCCATCTGCTGCC -3'	Dehr et al, 1995
CYP1A1	5'- GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3' 5'- AAGACCTCCCAGCGGGCAAT-3'	Hayashi et al, 1991
CYP1B1	5'-AACGTCATGAGTGCCGTGTGT -3' 5'- GGCCGGTACGTTCTCCAAATC-3'	Dehr et al, 1995
NQO1	5'-GGCTGGTTTGAGCGAGTGTTTC -3' 5'-ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG -3'	Traver et al, 1992
β-actin	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA -3' 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC -3'	Dehr et al, 1995

ARNT : 5'-*CACTTGGGATCC*-3'

5'-*CACTTGGTCGAC*-3'

是為了其它目地而加進 *Bam*HI 與 *Sal* I 的切點，不影響半定量 RT-PCR。

附表五

Gene	Thermocycle conditions			Cycles
	Thermocycle Predenature →	Thermocycle →	Further extention	
CYP1A1	94°C - 3 min	94°C - 1 min 60°C - 1 min 72°C - 1 min	72°C - 7 min	27
CYP1B1	94°C - 3 min	94°C - 50 sec. 56°C - 1 min 72°C - 1 min	72°C - 7 min	35
NQO1	94°C - 3 min	94°C - 50 sec. 58°C - 1 min 72°C - 1 min	72°C - 7 min	30
AhR	94°C - 3 min	94°C - 50 sec. 50°C - 1 min 72°C - 1 min 20 sec.	72°C - 7 min	32
Arnt	94°C - 3 min	94°C - 50 sec. 51°C - 1 min 72°C - 1 min 30 sec.	72°C - 7 min	32

七、統計方法

使用 Statistical Analysis System (SAS, Institute), 進行卡方檢定 (chi-square test) 與邏輯斯迴歸分析 (logistic regression analysis)。

對照組和肺癌病人組性別、年齡、抽煙與否等資料的差異性使用卡方檢定 (chi-square test), $p < 0.05$ 即表示二族群有顯著差異; 比較基因型和肺癌的相關性時, 則使用邏輯式迴歸分析。使用單變項與多變項邏輯式迴歸, 以 NQO1 基因多型態分析為例: 當比較 NQO1 基因與肺癌的關係時, 變數設定: 肺癌病人=0, 對照組=1; 男性=1, 女性=0; 抽煙=1, 不抽煙=0; wild-type NQO1(wt/wt)=1, 含變異對偶基因=0(wt/vt + vt/vt)。當考慮 wild-type NQO1 抽煙者得肺癌的危險性時, 具 wild-type NQO1 且抽煙者=1, 其餘=0 (見附表六~附表九)。

Odds 表示: p/q (p : 得病的機會; q : 不得病的機會)

多變項邏輯式迴歸分析公式:

$$\ln[\text{odds}] = b + a_1 \times \text{年齡} + a_2 \times \text{性別} + a_3 \times \text{抽煙} + a_4 \times \text{基因型}$$

odds ratio 代表: $[p_w / q_w] \div [p_{H+M} / q_{H+M}]$

95% CI 值為: $(OR^{1-1.96/\text{卡方值}}) < 95\% \text{ CI} < (OR^{1+1.96/\text{卡方值}})$, 因此當 95% CI 值通過 1 時, 表示 $[p_w / q_w] \div [p_{H+M} / q_{H+M}]$ 比值等於 1, 即 wild-type-NQO1 得病的機會, 與含變異對偶基因 NQO1 (wt/vt + vt/vt) 得病的機會可能相等, 因此在統計上沒有顯著差異。

附表六

邏輯式迴歸中 NQO1 基因型的變項設定

設定	性別	抽煙情況	NQO1 基因型	interaction
1	男性	抽煙	W type	W type 的抽煙者
0	女性	不抽煙	H+M type	其餘的人

附表七

邏輯式迴歸中 CYP1A1 基因型的變項設定

設定	性別	抽煙情況	CYP1A1 基因型
1	男性	抽煙	M type
0	女性	不抽煙	W+H type

附表八

邏輯式迴歸中 GSTM1 基因型的變項設定

設定	性別	抽煙情況	GSTM1 基因型
1	男性	抽煙	GSTM1 null
0	女性	不抽煙	GSTM1

附表九

邏輯斯迴歸中同時考慮 CYP1A1 與 GST M1 基因型的變項設定

設定	性別	抽煙情況	CYP1A1 與 GST M1
1	男性	抽煙	CYP1A1 M type 且 GST M1 null
0	女性	不抽煙	其餘的人

第三章 結果

第一節 NQO1 基因多型態與肺癌的關係

一、NQO1 基因型分析中，肺癌個案與對照組的性別、年齡、抽煙與否分佈

本研究包含了 190 個非肺癌個案(對照組)與 114 個肺癌個案，經卡方檢定結果顯示:對照組與肺癌個案之年齡分佈、性別分佈、抽煙與否分佈均具顯著性差異($P = 0.001$) (表一)。對照組與肺癌個案的平均年齡分別是 54.79 ± 12.09 歲， 63.51 ± 8.55 歲。性別方面，肺癌個案中女性佔 21.9% 比對照組 52.6% 較低；在抽煙人數與累積抽煙量(每天抽煙包數 \times 抽煙年數)方面，肺癌個案 41.23 ± 20.59 明顯比對照組 24.09 ± 17.48 高。當分別利用年齡、性別、抽煙與否進行單變項邏輯斯迴歸分析(Univariate logistic regression analysis)時，年齡、性別、抽煙與否這三個變項在統計上均與肺癌有明顯相關性，因此進一步利用多變項邏輯斯迴歸分析(Multivariate logistic regression analysis)，同時控制年齡、性別、抽煙與否來評估 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)與肺癌相關性。

二、比較肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學分類之 NQO1 基因型的分佈與肺癌相關性

當 NQO1 基因上 exon 6 第 609 個 base pair 由 C 突變成 T，會產生 *Hinf*I 酵素切點，因此當 PCR 片段大小為 211 bp 時為 wild type (C/C)基因型

(wt/wt)·PCR 片段大小為 211 bp + 165 bp + 46 bp 時為 heterozygous type (C/T) 基因型(wt/vt)，而 PCR 片段大小為 165 bp + 46 bp 時，則為 variant type: (T/T) 基因型(vt/vt)。

在對照組 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)與含變異對偶基因型(wt/vt + vt/vt)分別是 25.3%與 74.7% (表二)，其對偶基因分佈符合哈溫定律 (Hardy-Weinberg equilibrium，在一平衡的族群出現 wild type 對偶基因的機率與 variant type 對偶基因的機率 = 1)，對照組與肺癌個案之 wild type 對偶基因頻率(wild type allele frequency)分別是 0.53 與 0.54。因已有研究指出 heterozygote 基因變異型(wt/vt)會影響 NQO1 表現型(Kuehl et al. 1995)，降低 NQO1 酵素活性，因此將 NQO1 基因型分成二類：一是 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)；一是含變異對偶基因型(wt/vt + vt/vt)來進行統計分析。wild-type NQO1 基因型(wt/wt)在對照組中佔了 25.3%，經控制年齡、性別、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析後結果顯示：wild-type NQO1 基因型(wt/wt)在對照組(25.3%)與肺癌個案組(29.0%)並無差異($p = 0.297$, 表二)。

當將對照組與肺癌個案組依性別分類，控制年齡、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析後結果顯示：不論男性或女性之 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)在對照組與肺癌個案組均無顯著差異(男性 30.3%, $p = 0.176$ vs. 女性 24.0%, $p = 0.997$) (表二)。

接著將對照組與肺癌個案組分成抽煙與不抽煙分別比較：抽煙組中肺癌個案 wild-type NQO1 基因型(wt/wt) 比例比對照組明顯增加 (27.8% vs. 20.8%, $p = 0.046$, 表二)，控制年齡、性別、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴

歸分析後，wild-type NQO1 基因型(wt/wt)得肺癌的機會是其他 NQO1 基因型的 3.66 倍(OR = 3.66, 95% CI, 1.03 - 13.60)，在不抽煙組中 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)與肺癌則統計上無顯著相關性(OR=1.09,95% CI, 0.50-2.37)。

在本實驗中肺腺癌佔較大部分(總共 114 人中有 56 人, 49.1%)，其次是肺鱗狀上皮癌(總共 114 人中有 48 人, 42.1%)，已有前人研究指出抽煙是肺鱗狀上皮癌的重要危險因子(Travis et al, 1996; Gazdar et al, 1997)，但是抽煙與肺腺癌之相關性較弱，因此將病人依肺癌種類分成三組：肺腺癌與肺鱗狀上皮癌及其他肺癌。肺腺癌中抽煙與不抽煙與否分別是 26 人(46.4%)與 30 人(53.6)，而肺鱗狀上皮癌中抽煙與不抽煙人數分別是 39 人(81.3%)與 9 人(18.7%)。經控制年齡、性別、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析後顯示：wild-type NQO1 基因型(wt/wt)在這二種肺癌中並不是主要的危險因子(表二)。

三、肺腺癌的危險因子分析: NQO1 基因型、年齡、性別、抽煙

以多變項分析，同時控制年齡、性別後，單獨考慮抽煙與單獨考慮 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)皆不是肺腺癌病人得病的重要危險因子(OR = 1.22, 95% CI, 0.56 – 2.64；OR = 1.76, 95% CI, 0.93 – 3.35)，但是當抽煙者同時是 wild-type NQO1 基因型(wt/wt) 時，便會增加得肺腺癌的機率(OR = 4.52, 95% CI, 1.69 – 12.13, $p = 0.0024$) (圖一)。

四、肺鱗狀上皮癌的危險因子分析：NQO1 基因型、年齡、性

別、抽煙

以多變項分析，同時控制年齡與性別後，單獨考慮抽煙發現抽煙是肺鱗狀上皮癌病人得病的重要危險因子(OR = 9.42, 95% CI, 3.16 – 28.10)。而同時控制年齡與性別後，單獨考慮 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)，結果卻顯示 wild-type NQO1 基因型(wt/wt)不是肺鱗狀上皮癌病人得病的重要危險因子(OR = 1.21, 95% CI, 0.57– 2.58)，同時控制年齡與性別後，抽煙者同時是 wild-type NQO1 基因型(wt/wt) 亦不是肺鱗狀上皮癌病人得病的重要危險因子(OR=2.64, 95% CI, 0.80 – 8.67) (圖二)。

第二節 CYP1A1 基因多型態與肺癌的關係

一、CYP1A1，GSTM1 基因多型態分析中，肺癌個案與對照組之性別、年齡及抽煙與否分佈

本研究共包含了 188 個非肺癌個案與 109 個肺癌個案，經卡方檢定分析結果顯示:對照組與肺癌個案組之性別、年齡、抽煙與否具顯著性差異 ($p = 0.001$)。對照組與肺癌個案的平均年齡分別是 54.91 ± 12.00 歲及 63.62 ± 8.55 歲(表三)，肺癌個案中女性佔 22.0% 比對照組 53.2% 較低；在抽煙人數百分比與累積抽煙量(每天抽煙包數 \times 總抽煙年數)，肺癌個案組(39.18 ± 20.59)明顯比對照組(24.09 ± 17.48)高。當分別利用年齡、性別、抽煙與否進行單變項邏輯斯迴歸分析，結果顯示年齡、性別、抽煙與否這三個變項在統計上與肺癌有明顯相關性，因此利用多變項邏輯斯迴歸式分析

方法，同時控制年齡、性別、抽煙與否來評估 variant CYP1A1 基因型(vt/vt) 與肺癌相關性。

二、肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學分類之 CYP1A1 基因型的分佈

當 CYP1A1 基因上 3'-flanking region 第 250 個 base pair 發生鹼基置換，由 T 突變成 C 會產生 *Msp* I 酵素切點。因此當 PCR 片段為 340 bp 時為 wild type (T/T) 基因型(wt/wt)、PCR 片段為 340 bp + 200 bp + 140 bp 時為 heterozygous type (T/C) 基因型(wt/vt)、而 PCR 片段為 200 bp + 140 bp 時，則為 variant type (C/C) 基因型(vt/vt)。

在對照組 variant CYP1A1 基因型(vt/vt)與原生型及異質基因型 (wt/wt + wt/vt)分別是 12.8 %與 87.2 % (表四)，其對偶基因分佈符合哈溫定律 (Hardy-Weinberg equilibrium)，對照組與肺癌個案組之 wild type 對偶基因頻率(allele frequency)分別是 0.65 與 0.57。因已有研究指出同質基因變異型(vt/vt)會增加 CYP1A1 被誘導的能力，因此將 CYP1A1 基因型分成二類：一是 variant CYP1A1 基因型(vt/vt)；一是原生型及異質基因型(wt/wt + wt/vt)來進行統計分析。variant CYP1A1 基因型(vt/vt)在對照組(12.8%)與肺癌個案組(22.9%)，經控制年齡、性別、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析，結果顯示：variant CYP1A1 與肺癌在統計上並無顯著相關($p = 0.13$)。

我們進依步將對照組與肺癌個案組依性別分類後，同時控制年齡、抽

煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析，結果顯示：不論男性或女性之 variant CYP1A1 基因型(vt/vt)在對照組與肺癌個案組均無顯著差異(男性 24.7%, $p = 0.16$ vs. 女性 16.7%, $p = 0.84$) (表四)。接著當將對照組與肺癌個案組分成抽煙與不抽煙，再分別進行比較：抽煙組中肺癌個案 variant CYP1A1 基因型(vt/vt)比例比對照組增高(26.5% vs. 11.5%)，控制年齡、性別後 CYP1A1 基因型(vt/vt)得肺癌的機會是其他 CYP1A1 基因型的 2.15 倍(OR = 2.15, 95% CI, 0.64 – 7.06)，但統計上無明顯相關性($p = 0.21$)，在不抽煙組中控制年齡、性別後 variant CYP1A1 基因型(vt/vt)亦與肺癌無相關性($p = 0.49$) (OR = 1.42, 95% CI, 0.54 – 3.86)。

在本實驗中肺腺癌佔較大部分總共 109 人中有(52 人, 47.7%)，其次是肺鱗狀上皮癌總共 109 人中有(47 人, 43.1%)，將病人依肺癌種類分成三組：肺腺癌、肺鱗狀上皮癌及其他肺癌(包括混和型、轉移型與其他非肺腺癌、非鱗狀上皮癌)。在肺腺癌中，variant CYP1A1 基因型(vt/vt)佔 15.4%，肺腺癌中抽煙與不抽煙人數分別是 28 人(53.8%)與 24 人(46.29%)，而肺鱗狀上皮癌中抽煙與不抽煙人數分別是 37 人(78.7%)與 10 人(21.3%) (附表一)，經控制年齡、性別、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析後顯示：variant CYP1A1 基因型並不是肺腺癌危險因子(OR = 1.33, 95% CI, 0.52 – 3.39, $p = 0.56$)。但在肺鱗狀上皮癌中，variant CYP1A1 基因型(vt/vt) (31.9%)，比對照組(12.8%)明顯增加，同時控制年齡、性別、抽煙與否後進行多變項邏輯斯迴歸分析顯示：variant CYP1A1 基因型是肺鱗狀上皮癌危險因子，variant CYP1A1 基因型得肺鱗狀上皮癌的機率是其他 CYP1A1 基因型的 3.20 倍(95% CI, 1.25 – 8.56, $p = 0.02$)，統計上具有顯著差異(表四)。

第三節 GSTM1 基因型與肺癌的關係

一、肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否之 GSTM1 基因型的分佈

GSTM1 基因發生基因缺失時不會產生 PCR 產物，因此當 PCR 產物出現 165 bp 則具 GSTM1 基因型，而 GSTM1 基因缺失時則無 PCR 產物，判讀為 GSTM1 null。

在對照組 GSTM1 與 GSTM1 null 之頻率分別是 34.0% 與 66.0% (表五)，男性與女性中 GSTM1 null 分別是 63.6% 與 68.0%，抽煙與不抽煙者中 GSTM1 null 分別是 65.4% 與 66.2%。肺癌個案組中 GSTM1 null 明顯比對照組少(46.8% vs. 66.0%)，同時控制年齡、性別、抽煙與否進行多變項邏輯斯迴歸分析後，結果顯示 GSTM1 null 與肺癌呈現負相關，GSTM1 null 得肺癌的機率是 GSTM1 的 0.57 倍(OR = 0.57, 95% CI, 0.32 – 0.98, p = 0.04) 統計上具顯著差異；在性別方面，男性與女性中 GSTM1 null 分別是 45.9% 與 50.0%，男性與女性 GSTM1 null 得肺癌的機率分別是 GSTM1 的 0.68 倍與 0.48 倍(OR = 0.68, 95% CI, 0.33 – 1.41, p = 0.30; OR = 0.48, 95% CI, 0.19 – 1.18, p = 0.11)，統計上具顯著差異。

我們進一步將對照組與肺癌個案組分成抽煙與不抽煙分別進行比較：抽煙組中肺癌個案 GSTM1 null 比對照組低(47.1% vs. 66.0%, p = 0.83, 表五)，GSTM1 null 得肺癌的機會是 GSTM1 的 0.83 倍(OR = 0.83, 95% CI, 0.32 – 2.13) 統計上無顯著差異，在不抽煙組中肺癌個案 GSTM1 null 佔 46.3%，GSTM1 null 得肺癌的機會是 GSTM1 的 0.48 倍(OR = 0.48, 95% CI, 0.23 – 0.99, p = 0.05) 統計上具顯著差異。

二、肺腺癌與肺鱗狀上皮癌中 GSTM1 基因的分佈

病人依肺癌種類分成肺腺癌、肺鱗狀上皮癌與其他型三組，在肺腺癌中 GSTM1 null (40.4%)，比對照組(66.0%)低。已知年齡、男性及抽煙是肺腺癌與肺鱗狀上皮癌的危險因子，因此利用多變項邏輯斯迴歸分析後，GSTM1 null 與肺腺癌呈現負相關(OR = 0.41, 95% CI, 0.08 – 0.81, p = 0.01) 統計上具顯著差異。在肺鱗狀上皮癌 GSTM1 null (53.2%)，雖然比對照組(66.0%)低，經多變項邏輯斯迴歸分析後，GSTM1 null 與肺鱗狀上皮癌仍無顯著相關性(OR = 0.84, 95% CI, 0.39 – 1.84, p = 0.67) (表五)。

第四節 variant CYP1A1 基因型且缺乏 GSTM1 基因與肺癌的關係

一、肺癌個案與對照組中，同時考慮 CYP1A1 基因型與 GSTM1 基因的分佈

已有研究指出同時考慮 CYP1A1 基因與 GSTM1 基因多型性與肺癌有關，特別是肺鱗狀上皮癌，可以增加 9 倍的得病機會。因此我們也同時結合兩種基因型，以多變項邏輯斯迴歸分析探討基因多型態對肺癌的影響。當同時考慮 CYP1A1 與 GSTM1 基因型對肺癌的影響時，variant CYP1A1 且 GSTM1null 歸為一類，而其餘歸為一類。

在對照組中 variant CYP1A1/ GSTM1null 佔 8.0% (表六)，男性與女性中 variant CYP1A1/ GSTM1null 皆為 8.0%，在抽煙與不抽煙者中 variant CYP1A1/ GSTM1null 分別是 9.6%與 7.4%。肺癌個案組中 variant CYP1A1/ GSTM1 null (12.9%)，比對照組(8%)高，經控制年齡、性別、抽煙與否進行統計分析後結果顯示 GSTM1 null 得肺癌的機率是其他型的 1.28 倍 (OR = 1.28, 95 % CI, 0.53 – 3.1, p = 0.58) 統計上無顯著差異；在性別方面肺癌個案組男性與女性中 variant CYP1A1/ GSTM1 null 分別是 14.1% 與 8.3%。結論：雖然男性 variant CYP1A1/ GSTM1 null 的比例略微比對照組高(OR=1.40)，但統計上無意義。

我們進一步將對照組與肺癌個案組分成抽煙與不抽煙分別比較。抽煙組中肺癌個案 variant CYP1A1/ GSTM1 null 比對照組高(16.2% vs. 9.6%, p = 0.61) ，variant CYP1A1/ GSTM1 null 得肺癌的機會是其他型的 1.42 倍(OR = 1.42, 95% CI, 0.37– 5.47) 但無統計上意義，在不抽煙組中肺癌個案 variant CYP1A1/ GSTM1 null 佔 7.3%，mutant CYP1A1/ GSTM1 null 得肺癌的機會是其他型的 1.05 倍(OR = 1.05, 95% CI, 0.27– 4.08, P = 0.95) 但無統計上意義。結論：variant CYP1A1/GSTM1 null 在抽煙組與不抽煙組皆無顯著差異。

二、肺腺癌與肺鱗狀上皮癌中 CYP1A1 基因型與 GSTM1 基因的分佈

病人依肺癌種類分成肺腺癌、肺鱗狀上皮癌與其他癌症三組，在肺腺

癌中 CYP1A1/GSTM1 null 佔 7.7% (表六)，以多變項邏輯斯迴歸分析，同時控制年齡、性別與抽煙與否後，結果顯示 variant CYP1A1/ GSTM1 null 與肺腺癌沒有顯著相關(OR = 0.79, 95 % CI, 0.23 – 2.68, p = 0.70)；在肺鱗狀上皮癌 CYP1A1/GSTM1 null 佔 19.2 % 同樣以多變項邏輯斯迴歸分析，同時控制年齡、性別與抽煙狀態後，結果顯示 variant CYP1A1/ GSTM1 null 與肺鱗狀上皮癌仍沒有顯著相關(OR = 2.28, 95 % CI, 0.75– 6.91, p = 0.15)。

第五節 在 A427 與 CL-3 細胞株中，B[a]P 對 CYP1A1、CYP1B1、NQO1、AhR 與 Arnt 基因表現的影響

一、B[a]P 對 A427 與 CL-3 細胞株中 CYP1A1 基因表現的影響

CL-3 與 A427 為來源不同之肺腺癌細胞株，經本實驗室的研究結果發現相同劑量 B[a]P 對此二株細胞毒性不同，經由 PCR genotyping 後發現 A427 與 CL-3 之 CYP1A1, GSTM1 基因型不同：A427 CYP1A1 為 wild type，CL-3 CYP1A1 為 heterozygous；A427 為 GSTM1，CL-3 為 GSTM1 null；A427 與 CL-3 細胞株之 NQO1 皆為 heterozygous (圖三)。已知 CYP1A1 可以活化 B[a]P 成具有攻擊 DNA 的代謝產物，因此在細胞毒性不同，CYP1A1 與 GSTM1 基因型皆不同的情況下，我們進一步探討此二株細胞 CYP1A1 基因的表現是否有差異。

CYP1A1 PCR 產物大小為 210 bp， β -actin PCR 產物大小為 541 bp。在處理溶劑對照組(DMSO)的細胞株，測不到 basal level CYP1A1 基因，而

無 PCR 產物。A427 細胞株在處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後 CYPIA1 基因表現並沒有明顯增加。而 CL-3 細胞株在處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後，與處理 DMSO(溶劑對照組)的 CL-3 比較 CYPIA1 基因表現增加 3 倍以上。可知 B[a]P 可以誘導 CL-3 細胞株 CYPIA1 基因的表現，但是 BaP 不能誘導 A427 CYPIA1 基因(圖四)。

二、B[a]P 對 A427 與 CL-3 細胞株中 CYP1B1 基因表現的影響

因為在某些細胞株，CYP1B1 也會經由類似 CYPIA1 誘導的機理，被 B[a]P 所誘導(Savas and Jefcoate, 1994)，所以希望探討在肺癌細胞株，B[a]P 是否也能誘導 CYP1B1 基因的表現。

CYP1B1 PCR 產物大小為 360 bp， β -actin PCR 產物大小為 541 bp。在處理 DMSO (溶劑對照組)的細胞株，可以測到 basal level CYP1B1 基因，但是 basal level 較低。A427 細胞株在處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後 CYP1B1 基因表現並沒有明顯增加。而 CL-3 細胞株在處理 B[a]P 1 μ M、B[a]P 10 μ M 24 小時後，與處理 DMSO 的 CL-3 比較，CYP1B1 基因表現增加 3 倍。可知 B[a]P 可以誘導 CL-3 細胞株 CYP1B1 基因的表現，而在 A427 細胞株，B[a]P 不能誘導 CYP1B1 基因的表現(圖五)。

三、B[a]P 對 A427 與 CL-3 細胞株中 NQO1 基因表現的影響

NQO1 在某些細胞中，亦能經由類似 CYPIA1 的方式被誘導，因此我

們也希望了解在肺癌細胞株 B[a]P 是否也會影響 NQO1 基因的表現。

NQO1 PCR 產物大小為 268 bp， β -actin PCR 產物大小為 541 bp。二細胞株 basal level NQO1 基因的表現量很高，二細胞株處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後與處理溶劑對照組(DMSO)比較，NQO1 基因表現程度沒有顯著差異(圖六)。

四、B[a]P 對 A427 與 CL-3 細胞株中 AhR、Arnt 基因表現的影響

已知 CYP1A1 基因表現是經由 AhR 與 Arnt 形成 hetero dimer 複合物後，結合於 CYP1A1 基因上游而調控 CYP1A1 基因表現。因此我們進一步想了解在 A427 與 CL-3 細胞株中，是否因 AhR、Arnt 基因表現不同而影響 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因。

AhR PCR 產物大小為 183 bp，Arnt PCR 產物大小為 249 bp， β -actin PCR 產物大小為 541 bp。A427 與 CL-3 細胞株皆有 AhR 與 Arnt 基因表現，二細胞 AhR 基因的 basal level 並無差異，A427 細胞株與 CL-3 細胞株處理 1 μ M、10 μ M B[a]P 24 小時後並不會增加 AhR 基因表現，事實上在 CL-3 細胞株處理 10 μ M B[a]P 後 AhR 基因呈現減少的現象(圖七)。在 A427 與 CL-3 細胞株中，A427 Arnt 基因的 basal level 較高。A427 細胞株與 CL-3 細胞株處理 1 μ M、10 μ M B[a]P 24 小時後並不會改變 Arnt 基因表現(圖七)。

第五節 食用油煙霧(Cooking oil fume)對 CL-3 細胞株中 CYP1A1 基因表現的影響

肺癌流行病學研究結果顯示，影響肺癌發生的因子主要有大氣汙染、特殊職業危害、呼吸系統疾病、室內燃煤汙染等(鐘禮杰, 1991)。食用油煙本身經高溫加熱也會產生多種有毒物質，是室內重要汙染物之一。有研究指出，食用植物油中含有多種多環芳香羣類物質 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)(利署光等人, 1991)對蔬菜油和沙拉油加熱到 265 ± 5 °C，所產生的煙霧進行分析，發現含有 benzo[a]pyrene、dibenzo (a,h) anthracene 等毒性物質，其含量是未加溫油的幾十倍到幾百倍(Li et al, 1994)。因此我們進一步想了解食用油煙霧是否會誘導 CL-3 細胞株 CYP1A1 基因表現。CL-3 細胞處理 20 $\mu\text{g/ml}$ cooking oil fume 不會增加 CYP1A1 基因表現，隨著油煙濃度增加，200 $\mu\text{g/ml}$ cooking oil fume 相對於 DMSO(溶劑對照組)只增加 0.6 倍 CYP1A1 基因表現(圖八)。因此食用油中可能不含 PAHs 或 PAHs 含量太低不足以誘導 CYP1A1 基因表現。

第四章 結論與討論

一、NQO1 基因多型態與肺癌的關係

參與化學物質活化與解毒酵素的基因多型態已證實與肺癌有關 (Kawajiri, 1995; Mcwilliam, 1995)，而且亦有研究指出 NQO1 基因多型態與肺癌有關 (John, 1997)，因此本研究之目的在探討台灣肺癌病人中，NQO1 基因多型態 (NQO1 polymorphism) 與肺癌的相關性。由本實驗結果顯示，wild type NQO1 基因型分佈在肺癌個案組與對照組分別為 29.0% 與 25.3% (表二)，wild type NQO1 對偶基因頻率 (wild type NQO1 allele frequency) 在肺癌個案組與對照組分別為 0.53 與 0.54 (表二)；抽煙組中，wild type NQO1 基因型與肺癌有明顯相關性 (OR = 3.66, 95% CI, 1.03-13.60) (表二)。抽煙且同時帶有 wild type NQO1 基因型的人會增加罹患肺腺癌的機會 (OR = 4.52, 95% CI, 1.69-12.13) (圖一)。

已有報告指出種族差異與罹患肺癌的危險性有關，經由流行病學調查結果顯示，在考慮年齡的差異後，African-American 的肺癌發生率高於 Hispanic-American，而台灣肺癌的發生率 (38.5 / 10 萬人年) 遠低於美國 (60.2 / 10 萬人年)。因此，就肺癌發生機率來說，African-American 為高危險群，而我國肺癌發生率較低，NQO1 基因型分佈有同樣的趨勢。也就是說，肺癌發生率高，wild type NQO1 基因型也較高，我們的 wild type NQO1 基因型 (29.0%) 與亞洲民族所分析的研究結果 (31.4%) 相似。而在 Wiencke 等人 (1997) 的研究中 African-American 正常人中 wild type NQO1 的百分比為 61%，約為 Mexican-American (32%) 的兩倍。

由流行病學調查結果，吸煙為肺癌發生的重要環境因子，抽煙會增加罹患肺癌的危險性(Doll et al., 1994)。在 Mexican-American 與 African-American 種族中，依抽煙與否分成抽煙、戒煙和不抽煙三組，結果顯示只有在抽煙組中，wild-type NQO1 基因型才與肺癌有關係。同樣的在抽煙組中，wild-type NQO1 罹患肺癌的機會是其他基因型的 3.66 倍(OR = 3.66, 95% CI, 1.03-13.6) (表二)。我們進一步以組織學分類，將肺癌分成肺腺癌、肺鱗狀上皮癌和其他三類，且分別探討與 NQO1 基因型的相關性。研究結果顯示，抽煙與肺鱗狀上皮癌的相關性很高 (OR = 9.42, 95% CI, 3.16-28.10) (圖二)；但單獨考慮 wild-type NQO1 基因型或是抽煙且同時帶有 wild-type NQO1 基因型，則與肺鱗狀上皮癌無顯著相關。而在肺腺癌中，只有當抽煙且同時帶有 wild-type NQO1 基因型才與肺腺癌顯著相關(OR = 4.52, 95% CI, 1.69-12.13) (圖一)。由以上結果可以推測，NQO1 酵素在代謝活化某些肺癌的致癌物上扮演了重要角色。雖然 NQO1 酵素活性可以被香煙所誘導(Gasdaska et al, 1993)，而且 NQO1 酵素對 quinone 類化合物具有保護解毒的功能，但是 NQO1 酵素活性卻也和某些細胞致突變物及致癌物活化有明顯相關性(Cadenas, 1995)，例如，已有研究證實 NQO1 酵素可以活化 1,6- dinitropyrenes、1,3- dinitropyrenes 和 1,8-dinitropyrenes 等致突變物及致癌物(Hajos, 1991; Winston, 1992)，在動物實驗中已證實 dinitropyrenes 是很強的肺致癌物(Macda, 1986 ; Iwagawa, 1989)，而這些 dinitropyrenes 更廣泛分佈於柴油與城市中(Newton, 1989)。

在前人的研究中已知抽煙是肺鱗狀上皮癌的危險因子，但是與肺腺癌相關性較弱。就肺癌發生位置來看，肺腺癌發生的部位在肺周邊，而肺鱗狀上皮癌主要發生在肺的中心支氣管。空氣中的致癌物質可能附著於

香煙顆粒中，而分佈於肺的中心支氣管，而有些小分子可以經由血液循環而分佈於肺周邊位置。因此我們認為香煙中某些小分子經由血液循環而到達肺周邊位置，經 NQO1 酵素活化後而起始肺癌的發生、或香煙產生氣體直接擴散到肺周邊的肺泡組織。此外 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)是煙草裡特有的 nitrosamines，已經在香煙裡被鑑定出來(Gazder,1997)，可被 NQO1 酵素還原而活化為致癌物(Koga et al, 1990)，經由動物實驗已經證實經由皮下注射或是在飲水裡給予 NNK 會造成肺腺癌(Hecht and Hoffmann, 1990)。此外，香煙內亦含 2-amino-3-methylimidazo(4-5-f) quindine (IQ)，可被 NQO1 酵素活化為致癌物(De Flora et al, 1994)，經由慢性餵食在啮齒類動物會產生肺腺癌(Ohgaki et al, 1995)。因此本研究中抽煙者且同時帶有 wild-type NQO1 基因型罹患肺腺癌之機率較高，可能是與香煙中的 NNK 與 IQ 被 NQO1 活化為致癌物有關。

二、CYP1A1 & GSTM1 基因多型態與肺癌的關係

已有研究指出 CYP1A1 基因上 3'-flanking region *MspI* 限制酵素基因多型態與肺癌有關(Kawajiri, 1990)，然而參與解毒的 GSTM1 基因缺失也與肺癌有關(Hirvonen, 1993)。因此，本研究的目地在探討台灣肺癌病人中 CYP1A1 基因上 3'-flanking region *MspI* 限制酵素基因多型態及 GSTM1 基因缺失與肺癌的關係。

本研究中 variant CYP1A1 基因分佈在肺癌個案與對照組分別為 22.9% 與 12.8% (表四)，variant CYP1A1 對偶基因頻率(variant allele frequency)分佈在肺癌個案組與對照組為 0.43 與 0.35。GSTM1 null (GSTM1 基因缺失)

在肺癌個案與對照組分別為 46.8%與 66.0% (表五)。Variant CYP1A1 基因型在對照組為 12.8%，與肺鱗狀上皮癌(31.9%)有顯著相關(OR = 3.20, 95% CI, 1.25-8.16) (表四)，而 GSTM1 null 在對照組為 66.0%，與肺腺癌有顯著相關性(OR=0.41, 95% CI, 0.08-0.81) (表五)。

有關 CYP1A1 *MspI* 基因多型態與肺癌的相關性，東西方國家的研究結果並不一致，針對 Norway, Finland 及 Sweden 等西方國家不同種族的研究中，對照組之 variant CYP1A1 對偶基因頻率很低，分別為 0.11 (Tefre et al, 1991, Norway)，0.12 (Hirvonen et al, 1992, Finland)，0.08 (Alexandrie et al, 1994, Sweden)。本研究中，variant CYP1A1 對偶基因頻率為 0.35，與日本民族的研究中，variant CYP1A1 對偶基因頻率為 0.33(Nakachi et al, 1991, Japan)相似。因此在西方國家，可能是 variant CYP1A1 對偶基因頻率太低而導致 variant CYP1A1 基因型與肺癌沒有相關性 (Puga et al, 1997)。在病源學上，肺鱗狀上皮癌與抽煙有關，因此，我們以組織學分類來探討 variant CYP1A1 基因型與肺腺癌及肺鱗狀上皮癌的相關性。Nakachi 等人(1991)的研究指出，variant CYP1A1 基因型與肺鱗狀上皮癌有顯著的相關性(OR = 7.31, 95% CI, 2.13-25.12)，而在低劑量的抽煙者中，variant CYP1A1 基因型罹患肺鱗狀上皮癌的危險性更高(Nakachi et al, 1993)。我們的結果亦顯示，variant CYP1A1 基因型會增加罹患肺鱗狀上皮癌的危險性(OR = 3.20, 95% CI, 1.25-8.16)。然而在本研究中，variant CYP1A1 基因型與肺腺癌無相關性(表四)，可能是我們未將肺腺癌細胞分化程度與內生性賀爾蒙考慮在內，Taiol and Wynde 等人(1994)指出在病因學上，內因性及外因性荷爾蒙在女性肺腺癌中扮演重要角色，特別是在不抽煙的女性，而 Nakachi 等人(1995)依組織學肺腺癌細胞分化程度來比較，結果得知，variant

CYP1A1 基因型與分化較差的肺腺癌有關(OR = 4.51, 95% CI, 1.73-11.78)。

在 GSTM1 基因缺失與肺癌相關性研究方面，已有研究指出，GSTM1 基因缺乏會導致缺乏 GST μ 酵素活性 (Seidegard et al, 1988)，抽煙的人淋巴球中缺乏 GST μ 酵素時，會增加 3 倍以上肺癌敏感性(Seidegard et al, 1986；Seidegard et al, 1990)。因此，本研究的目的是在探討 GSTM1 基因缺失與台灣肺癌的關係。

在本研究中，對照組 GSTM1 基因缺失的比例(66.00%)比肺癌個案組高(46.89%)(表五)。GSTM1 null 的發生率大約是 20-50%，不同種族間發生基因缺失的頻率也有差異，亞洲民族比高加索人高，而黑人最低 (Daly et al, 1994；Mannervik and Danielson, 1988；Bell et al, 1993；Nakajima et al, 1995；Fryer et al, 1993)。有關 GSTM1 null 基因型與肺癌的關係，各研究結果並不一致。Zhond 等人(1991)、Brockmoller 等人(1993)與 Nakajima 等人(1995)分別針對 British、German 與 Finnish 等西方國家肺癌病人進行研究，結果均顯示 GST M1 null 基因型與肺癌沒有相關性。然而日本民族的研究結果卻顯示，在肺癌病人中 GST M1 null 基因型發生率 42-62%，增加罹患肺癌的機會(OR = 1.4, $p < 0.05$ ；OR = 1.6, $p = 0.5$) (Heckbert et al, 1992；Nakachi et al, 1993)，McWilliam 等人(1995)將來自 12 個不同的研究族群共 1539 個肺癌病人與 2135 個對照組合併分析後(包含 Heckbert 與 Nakachi 的研究族群)，結果顯示 GSTM1 null 與肺癌有關 (OR = 1.41, 95% CI, 1.23-1.61)。然而與台灣種族相近的中國大陸，在 Sun 等人研究結果中，肺癌病人與對照組 GSTM1 null 分別是 71.00% 與 51.19%，利用多變項邏輯斯迴歸，同時控制年齡、性別與抽煙後，結果顯示，GSTM1 null 與肺

癌有關(OR = 2.34, 95% CI, 1.63-3.35)，與本研究相同的是在全部中約有 50% - 70%的人為 GSTM1 null 基因型，但是仍不清楚在我們的研究族群中的干擾因素為何?為什麼 GSTM1 null 基因型與肺癌沒有統計上相關性?可能是樣本數目太少代表性不夠。

當同時考慮 CYP1A1 *Msp*I 與 GSTM1 基因多型態與肺癌的關係時，我們的研究結果顯示，variant CYP1A1 基因型且 GSTM1 基因型為缺失的人，不管在肺癌個案組(12.9%)或是肺鱗狀上皮癌(19.2%)均比對照組高(8.0%)，但與肺癌在統計上沒有顯著相關性。由於西方國家 variant CYP1A1 allele 發生頻率太低，因此 Alexandrie 等人(1994)將 variant type CYP1A1(wt/wt)與 hetero type CYP1A1(wt/vt)併為一類討論，結果在小於 65 歲的 Sweden 人中，variant CYP1A1 allele (wt/vt+vt/vt)且 GSTM1 基因型為缺失的人，與肺鱗狀上皮癌有關(OR = 3.0, 95% CI, 1.2-7.2)。當我們試著以同樣的方法發現這樣的基因組合，在我們的族群中沒有顯著差異(對照組 36.0%，肺腺癌 25.0%，肺鱗狀上皮癌 30.0%，全部肺癌個案 30.0, data not shown)。雖然我們的結果不盡滿意，但由 Alexandrie 等人(1994)的結果中可發現，肺鱗狀上皮癌中 variant CYP1A1 對偶基因且同時帶有 GSTM1 null 基因型(79%)比肺腺癌(63%)高，而我們的研究結果也有相同的情形(19.2% vs. 7.7%) (表十一)。單獨考慮 GSTM1 null 基因型時，亦可發現肺鱗狀上皮癌中 GSTM1 null 基因型(53.2%)比肺腺癌(40.4%)高。

三、B[a]P 影響 A427 與 CL-3 細胞株基因表現

B[a]P 是重要的致癌物，廣泛存於空氣中。本實驗室之前的研究結果

得知 CL-3 與 A427 二株肺腺癌細胞處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後，B[a]P 會抑致 CL-3 細胞生長，但對 A427 細胞沒有影響。因為 CYP1A1 可以代謝活化 B[a]P，而 GSTM1 可以解毒，因此我們試著從 CYP1A1 與 GSTM1 基因多型態來解釋二細胞株對 B[a]P 敏感性不同的原因。意外的發現 CYP1A1 基因型在 A427 細胞為 wild type，CL-3 細胞為 hetero type 基因型，GSTM1 基因型在 A427 細胞為 GSTM1，而 CL-3 細胞缺乏 GSTM1 基因，二株細胞 NQO1 皆為 hetero type 基因型(圖三)。二細胞株中 CL-3 細胞對 B[a]P 較敏感，由 Kiyohara 等人(1996)的研究得知 CYP1A1 *MspI* 基因型為 variant type 之 AHH 活性(代表 CYP1A1 酵素活性)被誘導的能力最高(13.61 倍)，而 CYP1A1 *MspI* 基因型為 wild type 基因型與 hetero type 其 AHH 活性被誘導的能力差不多(4.89 vs. 4.82)。因此由基因型的差異似乎不能解釋 B[a]P 對二株細胞株毒性為何不同。

因為 B[a]P 的毒性與 CYP1A1 被誘導之程度有關，因此我們偵測二株細胞 CYP1A1，與 CYP1B1 被誘導程度是否不同。半定量 RT-PCR 結果顯示，B[a]P 可以誘導 CL-3 細胞株 CYP1A1 與 CYP1B1 基因表現達 3 倍，而 A427 細胞株則不改變，儘管 NQO1 基因表現在此二株細胞中原本的表現量都很高，但是處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後並不影響此二株細胞 NQO1 基因表現，而且 CL-3 與 A427 二細胞株都有 AhR 與 Arnt 基因，且 AhR 與 Arnt 基因表現都不受 B[a]P 影響。CYP1A1 基因轉錄(transcription)受 AhR 調控，然而有研究指出在肺部有高量 AhR 與 Arnt 基因表現，而且人類血液中 CYP1A1 基因表現程度與 AhR、Arnt 基因表現程度有關(Hayashi et al, 1994)。由以上結果我們推測，人類肺癌細胞株對 B[a]P 敏感性不同，可能是 CYP1A1 與 CYP1B1 被誘導能力不同所致，而

其被誘導能力不同無法用 CYP1A1 基因型解釋。只能初步了解 CL-3 在處理 B[a]P 後會同時誘導 CYP1A1 與 CYP1B1 基因表現增加，而在此二細胞株中 NQO1 則持續表現，因此在 A427 細胞與 CL-3 細胞中似乎有一未知的因子參與 AhR 所調控的基因表現。

第五章 文獻

- Alexandrie, A. K., Sundberg, M. I., Seidegard, J., Tornling, G., and Rannug, A., Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1. *Carcinogenesis*, 15 (9): 1785-90, 1994.
- Amos, C. J., Caporaso, N. E., and Western, A. Host factors in lung cancer risk : a rivew of interdisciplinary studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention*, 1 : 5005, 1992.
- Antrell, E. T., Parr, G. A., Buebic, D. C., and Martin, R. R. Induction of AHH human pulmonary alvelor macrophages by cigaratte smoke, *J. Clin. Invest.*, 52 : 1881, 1973.
- Axelson, D., Andusso, K., Desai, G., et al. Indoor radon exposure and active passive smoking in relation to occurrence of lung cancer. *Scan. J. Work Environ. Health*, 14: 286-292, 1988.
- Belinsky, M., Jaiswal, A, K. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissue. *Cancer and Metastasis. Reviews*, 12(2): 103-117, 1993.
- Bell, D. A., Taylor, J. A., Paulson, D. F., Robertson, C. N., Mohler, J. L., and Lucier, G. W. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 that increase susceptibility to bladder carcinoma, *JNCI*, 85 : 1159, 1993.
- Binkova, B., Lewtas, J., Miskova, I., Lenicek, J., Sram, R. DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogenesis*, 16(5): 1037-46, 1995.
- Brockmoller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Nitz, M., and Roots, I. Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class μ isoenzymes μ and x in lung cancer patients and controls. *Cancer Res.*, 53: 1004, 1993.
- Cadenas, E. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in

quinone metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 49: 127-140, 1995.

Cenas, N., Nemeikaite, A., Dickancaite, E., Anusevicius, Z., Nivinskas, H., and Bironaitte, D. The toxicity of aromatic nitrocompounds to bovine leukemia virus-transformed fibroblasts: the role of single-electron reduction. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1268: 159-164, 1995.

Chaudhuri, P. K., Thomas, P. A., Walker, M. J., et al. Steroid receptors in human lung cancer cytosols. *Cancer Letter*, 16: 327-332, 1982.

Chen, C. J., Wu, M. M., Lee, S. S., et al. Atherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water: multiple risk factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease. *Arteriosclerosis*, 8: 452-60, 1988.

Chen, S., Know, R., Lewis, A. D., Friedlos, F., Workman, P., Deng, P. S., Fung, M., Ebenstein, D., Wu, K., and Tsai, T. M. Catalytic properties of NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase: study involving mouse, rat, human, and mouse-rat chimeric enzymes. *Mol. Pharmacol.*, 47: 934-939, 1995.

Daly, A. K., Cholerton, S., Armstrong, M., and Idle, J. R. Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a prediction of disease susceptibility. *Environ. Health Persp.*, 102 : 55, 1994.

De Flora, S., Bannicelli, C., D'Agostini, F., Izzotti, A., and Camoirano, A. Cytosolic activation of aromatic and heterocyclic amines: inhibition by dicoumarol and enhancement in viral hepatitis B. *Environ. Health Perspect.*, 6: 69-74, 1994.

Dohr, O., Vogel, C., and Abel, J., Different response of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321(2) : 405-12, 1995.

Dohr, O., Abel, J. Transforming growth factor-beta 1. Coregulates mRNA expression of aryl hydrocarbon receptor and cell-cycle-regulating genes in human cancer cell lines. *Biochemical & Biophysical Research Communication*. 241(1): 86-91, 1997.

- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S., Fujii-Kuriyama, Y. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem*, 269: 7337-27343, 1994.
- Fitzsimmons, S. A., Workman, P., Grever, M., Paull, K., Camalier, R., and Lewis, A. D. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor Cell Line Panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and E09. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88: 259-269, 1996.
- Fujii-Kuriyama, Y., Ema, M., Mimura, J., Matsushita, N., and Sogawa, K. Polymorphic forms of the Ah receptor and induction of the CYP1A1 gene. *Pharmacogenetics*, 5: S149, 1995.
- Gao y. t., Blot, W. J., Wei, Z., et al. Lung cancer among Chinese women. *Int. J. cancer*, 40: 604-9, 1987.
- Gazdar, A.F., and Minna, J. D. Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 1563-1565, 1997.
- Groppi, A., Coutelle, C., Fleury, B., Iron, A., Begueret, J., and Couzigou, P. Glutathione S-transferase class μ in French alcoholic cirrhotic patients. *Hum. Genet.*, 87: 628-30, 1991.
- Hakkola, J., Pasanen, M., Pelkonen, O., Hukkanen, J., Evisalmi, S., Anttila, S., Rane, A., Mantyla, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., Tooming, M., and Raunio, H. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cell. *Carcinogenesis* 18(2): 391-7, 1997.
- Hayashi, S. I., Watanabe, J., Nakochi, K., and Kawajiri, K. Genetic linkage of lung cancer-associated MSP1 polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J. Biochem.*, 110: 407-11, 1991.
- Hayashi, S., Watanabe, J., Nakachi, K., Eguchi, H., Gotoh, O., Kawajiri, K. Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis*. 15(5): 801-6, 1994.
- Hecht, S. S., Isaacs, S., and Trushin, N. Lung Tumor Induction A/J mice by

the Tobacco Smoke Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone and Benzo[a]pyrene : A Potentially Useful Model for Evaluation of Chemopreventive Agents. *Carcinogenesis*, 15: 2721-2725, 1994.

Heckbert, S. R., Weiss, N. S., Hornung, S. K., Eaton, D. L., and Motulsky, A. G. Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84: 414, 1992.

Hornig, S. F., Liaw, K. F., Lin, L. J., et al. A cohort study on lung cancer in the endemic area of blackfoot disease. *Aaachin. Aj. Aapublic Health (Taipei)*, 14(1): 32-40, 1995.

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Manmade Mineral Fibers and Radon. Vol 43. Lyon : International Agency for Research on Cancer, 1988.

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Overall evaluations of Carcinogenicity: an updating of LARC Monographs. Vol 1 to 42, supplement 7. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987.

Iwagawa, M., Maeda, T., Izumi, K., Otsuka, H., Nishifuji, K., Ohnishi, Y., and Aoki, S. Comparative Dose-response Study on the Pulmonary Carcinogenicity of 1,6-Dinitropyrene and Benzo[a]pyrene Rats. *Carcinogenesis*, 10: 1283-1290, 1989.

Iwagawa, M., Maeda, T., Izumi, K., Otsuka, H., Nishifuji, K., Ohnishi, Y., and Aoki, S. Comparative Dose-response Study on the Pulmonary Carcinogenicity of 1,6-Dinitropyrene and Benzo[a]pyrene Rats. *Carcinogenesis*, 10: 1283-1290, 1989.

Jaiswal, A. K. Human NAO(P)H:Quinone Oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry*, 30: 10647-53, 1991.

Jeffrey, A. M., Weinstein, I. B., Jennette, K. W., Grzeskowiak, K., Nakanishi, K., Harver, R. G., Autrup, H., and Harris, C. Structures of benzo[a]pyrene-nucleic acid adducts fformed in human and bovine bronchial explants.

Nature, 269: 348, 1977.

- Joseph, p., and Jaiswal, A.K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-ONA adducts quenerated by cytochrome P450(A) and P450 reductase Proc. *Natl. Sci. USA.*, 91 :8413-8417, 1994.
- Karki, N. T., Pokels, R., Neutice, L., and Pekonen, O. Aryl hydrocarbon hydroxylase in lymphocytes and lung tissue form lung cancer patients and controls. *Int. J. Cancer*, 39 :565, 1987.
- Kato S., Bowman E., Harrington A., Blomeke, B., and Shields, P. G. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *JNCI*, 87(12): 902,
- Kawajiri, K., Nakachi, K, Imai, K., et al. Germline polymorphisms of P53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis*, 14(6): 1085-9, 1993.
- Kawajiri, K., Nakachi, K, Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N., Watanabe, J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Letters*, 263(1):131-3, 1990.
- Kellerman, G., Shaw, C. R., and Luffer-Kellerman, M. AHH inducibility and bronchogenic carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 289: 93, 1973.
- Ketterer, B., Harris, J. M., Talaska, G., Meyer, D. J., Pemble, S. E., Taylor, J. B., Lang N. P., and Kadlubar, F. F. The human glutathione-s-transferase supergene family, its polymorphisms, and its effects on susceptibility to smoking-related cancer. *Environ. Health Persp.*, 98: 87, 1992.
- Kihara M., Noda K., Kihara M., Distribution of GST M1 null genotype in relation to gender , age and smoking status in Japaneses lung cancer patients. *Pharmacogenetics*, 5(6): S74-79, 1995.
- Kiyohara, C., Hirohata, T., and Inutsnka, S. The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. *Jpn. J. Cancer Res.* 87:18-24, 1996.

- Kouri, R. E., Billups, L. H., Rude, T. H., Whitmire, C. E., Sass, B., and Henry, C. J. Correlation of inducibility of AHH with susceptibility to 3-methycholanthrene-induced lung cancers. *Cancer Lett.*, 9: 277, 1980.
- Kouri, R. E., McKinney, C. E., Levine, A. S., Edwards, B. K., Vesell, E. S., Nebert, D. W., and McLemore, T. L. Variations in AHH activities in mitogen-activated human and nonhuman primate lymphocyte. *Toxicol. Pathol.*, 12: 44, 1984.
- Kress, S., and Greenlee, W. F. Cell-specific regulation of human CYP1A1 and CYP1B1 genes. *Cancer research* 57:1264-69, 1997.
- Kuehl, B. L., Paterson, J. W. E., Peacock, J. W., Paterson, M. C., and Rauth, A. M. Presence of a heterozygous substitution and its relationship to DT-diaphorase activity. *British J. Cancer*, 72: 555-561, 1995.
- Kune, G. A., Kune, S., Waston, L. F., et al. Serum level of β -carotene, vitamin A, and zinc in male lung cancer cases and controls. *Nutr. Cancer*, 12: 169-76, 1989.
- Lafuente, A., Pujol, F., Carretero, P., Villa, J. P., and Cuchi, A. Human glutathione S-transferase μ gene deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer. *Cancer Lett.*, 68: 49, 1993.
- Landi, M. T., Bertazzi, P. A., Shields, P. G., Cleark, G., Lucier, G. W., Garte, S. J., Cosma, G., and Caporaso, N. E. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics*, 4: 242, 1994.
- Lee, L. T., Lee, W. C., Lin, R. S., et al. Age-period-cohort analysis of lung cancer mortality in Taiwan, 1966-1990. *Anticancer Res.*, 73:129-146, 1974.
- Li, S. G., Pan, D. G., Wang, G. X. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cookig oil fume. *Arch. Environ. Helth.* 49(2): 119-122, 1994.
- Li, Y., and Jaiswal, A. K. Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene: role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* 267:15097-104, 1992.

- Li, R., Bianchet, M. A., Talalay, P., and Amzel, L. M. The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy : mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8846-8850, 1995.
- Liu, L., and Wang, L. H. Correlation between lung cancer prevalence and activities of aryl hydrocarbon hydroxylase and glutathione s-transferase in human lung tissues. *Biomedical & Environmental Science*, 1(3): 277-82, 1988.
- Luh, K. T., Kuo, S. W., Lin, C. C., et al. Primary lung cancer in Taiwan. *J. Formosan Med. Assoc.*, 73: 129-146, 1974.
- Mannervik, B. and Danielson, U. H.. Glutathione transferase-structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23: 281, 1998
- Mannervik, B., and Danielson, U. H. Glutathione transferase: structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 23: 281-337, 1976.
- McWilliams, J. E., Sanderson, B. J. S., Harris, E. L., Richert-Boe, K. E., and Henner, W. D. Glutathione S-transferase M1 deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 4: 589, 1995.
- Menkes, M. S., Comstock, G. W., Vuilleunier, J. P., et al. Serum b-carotene, vitamin A, and E, selenium, and the risk of lung cancer. *New Engl. J. Med.*, 315: 1250-54, 1986.
- Miller, E. C., and Miller, J. A. Search for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47: 2327, 1981.
- Nakachi, K., Hayashi, S-I, Kawajiri, K., and Imai, K. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphism with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis*, 16(9):2209-13, 1995.
- Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., et al. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp1 polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J. Biochem.*, 110: 407-11, 1991.
- Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., et al. Identification of genetically high

risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett.*, 263: 131-3, 1990.

Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., Kawajiri, K. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Research*, 53(13): 2994-9, 1993.

Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., Watanabe, J., Kawajiri, K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Research*, 51(9): 5177-80, 1991

Nakajima, T., Elovaara, E., Anttila, S., Hirvonen, A., Camus, A. M., Hayes, J. D., Ketterer, B., and Vainio, H. Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis*, 16(4): 707, 1995.

Nazar-Stewart, V., Motulsky, A. G., Eaton, D. L., White, E., Hornung, S. K., Leng, Z. T., Stapleton, P., and Weiss, N. S. The glutathione S-transferase μ polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma, *Cancer Res.*, 53: 2313, 1993.

Nebert, D. W. The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation and birth defects. *Critical Reviews in Toxicology*, 20(3): 153-74, 1989.

Nebert, D. W., and Tones, J. E. Regulation of the mammalian cytochrome P450 (CYP1A1) gene. *Int. J. Biochem.*, 21: 234-52, 1989.

Nesnow, S., Ross, J., Nelson, G., Holden, K., Erexson, G., Kligerman, A., and Gupta, R. C. Quantitative and Temporal Relationships between DNA Adduct Formation in Target and Surrogate Tissues : Implications for Biomonitoring. *Environ. Health Perspect.*, 101: 37-42, 1993.

Nomura, A. M. Y., Stemmermann, G. N., Heilbrun, L. K., et al. Serum vitamin level and the risk of cancer of specific sites in men of Japan ancestry in Hawaii. *Cancer Res.*, 45: 2369-2372, 1985.

Patorino, U., Pisani, P., Berrino, et al. Vitamin A and female lung cancer: A case-control study on plasma and diet. *Nutr. Cancer*, 10: 171-9, 1987.

- Puga, A., Nebert, D. W., Mckinnon, R. A., and Menon A. G. Genetic polymorphisms in Human Drug-mteabolizing enzyme:potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance. *Critical reviews in toxicology*, 27(2):199-222, 1997.
- Redmond D. E. Tobacco and Cancer: The first clinical report, 1761. *N. Eng. J. Med.*, 282: 18-23, 1970.
- Ross, D., Beall. H., Traver, R. D., Siegel, D., Phillips, R. M., and Gibson, N. W. Bioactivation of quinones by DT-diaphorase, molecular, biochemical, and chemical studies. *Oncol. Res.*, 6: 493-500, 1994.
- Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H., and Haugen, A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.*, 54: 5081, 1994.
- Salonen, J. T., Salonen, R., Lappetelainen R. Risk of cancer in relatiion to serum concentrations of selenium and vitamin A and E: Matched case-control analysis of prospective data. *Br. Med. J.*,290: 417-20, 1985.
- Savas, U., and Jefcoate, C. R. Dual regulation of cytochrome P450EF expression via the aryl hydrocarbon receptor and protein stabilization in C3H/10T1/2 cells. *Molecular Pharmacology*, 45(6): 1153-9, 1994.
- Seidegard, J. Peru, R. W., Markowitz, M. M., Roush, G., Miller, D. G., and Beattie, E. J. Isozymes of qlutathione transferase (class mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow-up study. *Carcinogenesis.*, 11: 33-6, 1990.
- Seidegard, J., Pero, R., Miller, D., and Beattie, E. A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, 7: 751-3, 1986.
- Seidegard, J., Vorachek, W. R., Pero, R. D., and Pearson, W. R. Hrereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxido are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7293-7, 1988.
- Shields, P. G., Baumen, E. D., and Harrington. A. M. Polycycdle aromatic hydrocarbon DNA adducts in human lung and cancer susceptbility genes.

Cancer Res., 53, 3486, 1992.

Shields, P. G., Sugimura, H., Caporaso, N. E., et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and the CYP1A1 restriction fragment length polymorphism. *Environ. Health. Prespect.*, 98: 191-4, 1992

Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P., Sutter, T. R. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 IB1. *Cancer Research*, 56(13): 2979-84, 1996.

Shimada, T., Yun, C-H., Yamazaki, H., Gautier, J-C., Beaune, P. H., and Guengerich, F. P. Characterization of human lung microsomal cytochrome P450 IA1 and its role in oxidation of chemical carcinogens. *Mol. Pharmacol.*, 41:856-841, 1992.

Soni, M. G., Krishna. T. p., and Krishnaswany, K., Human leukocyte glutathione-s-transferease isozyme(class mu) and susceptibibility to smoking-related cancer, *J. Tox. Environ. Health*, 46: 1, 1995.

Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., De Pasquale, J. A., Pentecost, B. T., Fasco, M. J., Li, Y., Sutter, T. R. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cell and breast tumor cells. *Carcinogenesis*, 19(2): 291-8, 1998.

Sun, G. F., Shimozo, N., Pi, J. B., Lee, S., Kumagai, Y. Gene deficiency of glutathione S-transferase mu isoform associated with susceptibility to lung cancer in a Chinese population. *Cancer Letters.*, 113 (1-2) :169-72, 1997.

Tang, Y. M., Wo, Y. Y. P., Stewart, J., Hawkin, A. L., Griffin, C. A., Sutter, T. R., and Greenlee, W. F. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45): 28324-30, 1996.

Tay S. C., Tsai, S. F., Lee, S. S., et al. Lung cancer in Taiwan. *Natl Public Health Assoc(ROC)*8(3): 189-201, 1988.

Traver, R. D., Horikoshi, T., Danenberg, K. D., Stadlbauer, T. H. W., Danenberg, P. V., Roos, D., and Gibson, N. W. NAD(P)H:quinone

- oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cell: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res.*, 52: 797-802, 1992.
- Traver, R. D., Siegel, D., Beall, H. D., Phillips, R. M., Gibson, N. W., Franklin, W. A., and Ross, D. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *British J. of Cancer*, 75(1): 69-75, 1997.
- Travis, W. D., Lubin, J., Ries, L., and Devesa, S. United states lung carcinoma incidence trends. *Cancer*, 77: 2464-70, 1996.
- Venugopal, R., and Jaiswal, A. K. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fral1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase₁ gene. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 93: 14960-14965, 1996.
- Waid, N., Idle, M., Borcham, J., et al. Low serum vitamin A and subsequent risk of cancer risk: Preliminary results of a prospective study. *Lancet*, 2: 813-15, 19980.
- Wheeler, C. W. and Guenther, T. M. Cytochrome P450-dependent metabolism of xenobiotics in human lung. *J. Biochem. Toxicol.*, 6, 163, 1991.
- Widersten, M., Pearson, W. R., Engstrom, A., and Mannerik, B. Heterologous expression of the allelic variant m-class glutathione S-transferase μ and χ . *Biochem. J.*, 276 : 519, 1991.
- Wiencke, J. K., Spitz, M. R., McMillan, A. and Kelsey, K. T. Lung cancer in Mexican-Americans and African-Americans is associated with the wild-type genotype of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism. *Cancer Epidemiology Biomarker and Prevention*, 6: 87-92, 1997.
- Willet, W. C., Polk, B. F., Underwood B. A., et al. Relation of serum vitamin A and E and carotenoids to the risk of cancer. *N. Engl. J. Med.*, 310: 430-434, 1985.
- Wilson, V. L., Weston, A., Manchester, D. K., Trivers, G. E., Roberts, D. W., Kadlubar, F. F., Wild, C. P., Montesano, R., Willey, J. C., and Mann, D. L.

Alkyl and aryl carcinogen adducts detected in human peripheral lung. *Carcinogenesis*, 10: 2149, 1989.

Witschi, H., Espiritu, I., Maronpot, R. R., Pinkerton, K. E., and Jones, A. D. The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 18(11): 2035-42, 1997.

Wolterbeek, A. P. M., Roggeband, R., Steenwinkel, M. J. S. T., Bann, R. A., and Rutten, A. A. J. J. L. Formation and Repaire of Benzo[a]pyrene-DNA Adducts in Cultured Hamster Tracheal Epithelium Determined by ³²P-Postlabeling Analysis and Unscheduled DNA Synthesis. *Carcinogenesis*, 14: 463-467, 1993.

Yang, S. P., Luh, K. T., Kuo, S. h., et al. Chronological observation of epidemiological characteristics of lung cancer in Taiwan with etiological consideration-A 30-year consecutive study. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 14(1): 7-19, 1984.

Yoshida. T., and Tsude. H. Gene targeting of DT-diaphorase in mouse embryonic stem cells: establishment of null mutant and its mitomycin C-resistance. *Biochem Biophy. Res. Commun.*, 214: 701-708, 1995.

Yoshikawa, M., Arashidani, K., Kawamoto, T., Kodama, Y. Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lung tissue: in relation to cigarette smoking and lung cancer. *Environmental Research*. 65(1): 1-11, 1994.

Zhong, S., Howie, A. F., Ketterer, B., Taylor, J., Hayes, J. D., Beckett, G. J., Wathen, C. G., Wolf, C. R., and Spurr, N. K. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 12: 1533, 1991.

Zhong, S., Wyllie, A. H., Barnes, D., Wolf, C. R., and Spuer, N. K. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*, 14: 1821, 1993.

利署光、潘定華、汪國雄 (1991) 食用油及其加熱過程中的 benzo[a]pyrene and dibenzo(a,h)anthracene 含量分析. *上海環境科學*, 10(9): 35.

利署光、潘定華、汪國雄 (1991) 薄層掃描法測定食用油及其加熱產物中

多環芳香輕含量. 衛生研究, 20(4): 44-46.

陸坤泰、張登斌 (1992) 台灣的肺癌. 台灣醫誌, 91 卷附冊 1: s1-s6.

蕭光明 (1992) 台灣地區肺癌之流行病學特徵. 臨床醫學, 29: 347-352.

鐘禮杰、鄭蘇釩 (1991) 肺癌危險因素的多元 logistic 迴歸分析. 癌, 11(6):
251.

表一. NQO1 基因多型態分析中肺癌個案與對照組之基本統計資料

	肺癌個案組 (%)	對照組 (%)	P ^a
全部個案	114	190	
性別			0.001
男性	89 (78.1)	90 (47.4)	
女性	25 (21.9)	100 (52.6)	
年齡			0.001
≤40	2 (1.8)	26 (13.7)	
41-50	9 (7.9)	50 (26.3)	
51-60	22 (19.3)	44 (23.2)	
61-70	58 (50.9)	55 (28.9)	
>70	23 (20.1)	15 (7.9)	
平均值 ± 標準差	63.51 ± 8.55	54.79 ± 12.09	
抽煙與否			0.001
抽煙	72 (63.2)	53 (27.9)	
抽煙量(包)/日	1.07 ± 0.49	0.83 ± 0.43	
總抽煙年數	38.00 ± 11.28	28.71 ± 14.58	
累積抽煙量 ^b	41.23 ± 23.33	24.00 ± 17.28	
不抽煙	42 (36.8)	137 (72.1)	

a. 肺癌病人組與對照組的差異使用卡方檢定

b. 累積抽煙量 = [抽煙量(包)/日] × 總抽煙年數

表二. 肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學分類之NQO1基因型分佈

		NQO1 基因型	肺癌個案(%) (n=114)	對照組(%) (n=190)	OR ^a	95% CI	P-value
全部個案		wt/wt	33 (29.0)	48/190 (25.3)	1.38 ^b	0.76-2.50	0.297
		wt/vt + vt/vt	81 (71.0)	142/190 (74.7)			
性別	男性	wt/wt	27/89 (30.3)	24/90 (26.6)	1.76 ^c	0.78-3.97	0.176
		wt/vt + vt/vt	62/89 (69.7)	66/90 (73.4)			
	女性	wt/wt	6/25 (24.0)	24/100 (24.0)	1.00 ^c	0.36-2.97	0.997
		wt/vt + vt/vt	19/25 (76.0)	76/100 (76.0)			
抽煙與否	抽煙	wt/wt	20/72 (27.8)	11/53 (20.8)	3.66 ^d	1.03-13.6	0.046
		wt/vt + vt/vt	52/72 (72.2)	42/53 (79.2)			
	不抽煙	wt/wt	13/42 (31.0)	37/137 (27.0)	1.09 ^d	0.50-2.37	0.821
		wt/vt + vt/vt	29/42 (69.0)	100/137 (73.0)			
組織學分類	肺腺癌	wt/wt	21/56 (37.5)		1.72 ^b	0.87-3.40	
		wt/vt + vt/vt	35/56 (62.5)				
	肺鱗狀上皮癌	wt/wt	12/48 (25.0)		2.24 ^b	0.86-5.84	
		wt/vt + vt/vt	36/48 (75.0)				
	其他	wt/wt	0/10 (0.0)				
		wt/vt + vt/vt	10/10 (100.0)				

a. Odds ratios were calculated to measure the association of wild-type NQO1 and lung cancer risk.

b: adjusted for age, sex, and smoking status

c: adjusted for age and smoking status

d: adjusted for age and sex

The number in control : wt/wt=48, wt/vt=107, vt/vt=35.

The wild type allele frequency in control= $(48 \times 2 + 107) / (190 \times 2) = 0.53$

The number in control : wt/wt=33, wt/vt=56, vt/vt=25.

The wild type allele frequency in control= $(33 \times 2 + 56) / (114 \times 2) = 0.54$

表三. CYP1A1-GSTM1 基因多型態分析中肺癌個案與對照組之基本統計資料

	肺癌個案 (%)	對照組 (%)	P ^a -vaule
全部個案	109	188	
性別			0.001
男性	85 (78.0)	88 (46.8)	
女性	24 (22.0)	100 (53.2)	
年齡			0.001
≤40	2 (1.8)	25 (13.3)	
41-50	8 (7.3)	49 (26.1)	
51-60	21 (19.3)	45 (23.9)	
61-70	56 (51.4)	54 (28.7)	
>70	22 (20.2)	15 (8.0)	
平均值 ± 標準差	63.62 ± 8.55	54.9 ± 12.00	
抽煙與否			0.001
抽煙	68 (62.4)	52 (27.7)	
抽煙量 (包/日)	1.04 ± 0.46	0.80 ± 0.40	
總抽煙年數	37.97 ± 11.22	28.44 ± 14.65	
累積抽煙量 ^b	39.18 ± 20.59	24.09 ± 17.48	
不抽煙	41(37.6)	136 (72.3)	

a. 肺癌病人組與對照組的差異使用卡方檢定

b. 累積抽煙量 = 抽煙量 (包/日) × 總抽煙年數

表四. 肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學分類之 CYP1A1 基因型分佈與肺癌的關係

		CYP1A1 基因型	肺癌個案(%) (n=109)	對照組(%) (n=188)	OR ^a	95% CI	P-value
全部個案		wt/wt + wt/vt	84/109 (77.1)	164/188 (87.2)			
		vt/vt	25/109 (22.9)	24/188 (12.8)	1.73 ^b	0.85 - 3.55	0.13
性別	男性	wt/wt + wt/vt	64/85 (75.3)	79/88 (89.8)			
		vt/vt	21/85 (24.7)	9/88 (10.2)	2.03 ^c	0.77 - 5.36	0.16
	女性	wt/wt + wt/vt	20/24 (83.3)	85/110 (85.0)			
		vt/vt	4/24 (16.7)	15/100 (15.0)	1.13 ^c	0.34 - 3.81	0.84
抽煙與否	抽煙	wt/wt + wt/vt	50/68 (73.5)	46/52 (88.5)			
		vt/vt	18/68 (26.5)	6/52 (11.5)	2.15 ^d	0.64 - 7.06	0.21
	不抽煙	wt/wt + wt/vt	34/41 (82.9)	118/136 (86.8)			
		vt/vt	7/41 (17.1)	18/136 (13.2)	1.42 ^d	0.53 - 3.86	0.49
組織學分類	肺腺癌	wt/wt + wt/vt	44/52 (84.6)				
		vt/vt	8/52 (15.4)		1.33 ^b	0.52 - 3.39	0.56
	肺鱗狀上皮癌	wt/wt + wt/vt	32/47 (68.1)				
		vt/vt	15/47 (31.9)		3.20 ^b	1.25 - 8.16	0.02
	其他	wt/wt + wt/vt	8/10 (80.0)				
		vt/vt	2/10 (20.0)				

a. vt/vt type CYP1A1 vs. wt/wt+wt/vt CYP1A1 individuals

b. adjusted for age, sex and smoke status

c. adjusted for age and smoke status

d. adjusted for age and sex status

The number in control : wt/wt=80, wt/vt=84, vt/vt=24.

The wild type allele frequency in control $(80 \times 2 + 84) / (188 \times 2) = 0.65$

The number in control : wt/wt=41, wt/vt=43, vt/vt=25.

The wild type allele frequency in control $(41 \times 2 + 43) / (109 \times 2) = 0.57$

表五. 肺癌個案與對照組中，性別、抽煙與否及組織學分類之 GSTM1 基因型分佈與肺癌的關係

		GST M1 基因型	肺癌個案組 (%) (n=109)	對照組(%) (n=188)	OR ^a	95% CI	P-value
全部個案		M1	58/109 (53.2)	64/188 (34.0)			
		null	51/109 (46.8)	124/188 (66.0)	0.57 ^b	0.33 - 0.98	0.04
性別	男性	M1	46/85 (54.1)	32/88 (36.4)			
		null	39/85 (45.9)	56/88 (63.6)	0.68 ^c	0.33 - 1.41	0.30
	女性	M1	12/24 (50.0)	32/100 (32.0)			
		null	12/24 (50.0)	68/100 (68.0)	0.48 ^c	0.19 - 1.18	0.11
抽煙與否	抽煙	M1	36/68 (52.9)	18/52 (34.6)			
		null	32/68 (47.1)	34/52 (65.4)	0.83 ^d	0.32 - 2.13	0.83
	不抽煙	M1	22/41 (53.7)	46/136 (33.8)			
		null	19/41 (46.3)	90/136 (66.2)	0.48 ^d	0.23 - 0.99	0.05
組織學分類	肺腺癌	M1	31/52 (59.6)				
		null	21/52 (40.4)		0.41 ^b	0.08 - 0.81	0.01
	肺鱗狀上皮癌	M1	22/47 (46.8)				
		null	25/47 (53.2)		0.84 ^b	0.39 - 1.84	0.67
	其他	M1	4/10 (40.0)				
		null	6/10 (60.0)				

a. GST M1 null vs. GST M1

b. adjusted for age, sex and smoke status

c. adjusted for age and smoke status

d. adjusted for age and sex status

表六. 同時考慮 CYP1A1 基因型及 GSTM1 基因缺失與肺癌的相關性

		CYP1A1 基因型	GSTM1 基因型	肺癌個案 (%) (n=109)	對照組(%) (n=188)	OR ^a	95% CI	P-value
全部個案		wt/wt + wt/vt	M1	47/109 (43.1)	55/188 (29.2)			
		wt/wt + wt/vt	null	37/109 (33.9)	109/188 (58.0)			
		vt/vt	M1	11/109 (10.1)	9/188 (4.8)			
		vt/vt	null	14/109 (12.9)	15/188 (8.0)	1.28 ^b	0.53 - 3.1	0.58
性別	男性	wt/wt + wt/vt	M1	37/85 (43.5)	30/88 (34.1)			
		wt/wt + wt/vt	null	27/85 (31.8)	49/88 (55.7)			
		vt/vt	M1	9/85 (10.6)	2/88 (2.3)			
		vt/vt	null	12/85 (14.1)	7/88 (8.0)	1.40 ^c	0.45 - 4.36	0.56
	女性	wt/wt + wt/vt	M1	10/24 (41.7)	25/100 (25.0)			
		wt/wt + wt/vt	null	10/24 (41.7)	60/100 (60.0)			
		vt/vt	M1	2/24 (8.3)	7/100 (7.0)			
		vt/vt	null	2/24 (8.3)	8/100 (8.0)	1.02 ^c	0.20 - 5.19	0.98
抽煙與否	抽煙	wt/wt + wt/vt	M1	29/68 (42.6)	17/52 (32.7)			
		wt/wt + wt/vt	null	21/68 (30.9)	29/52 (55.8)			
		vt/vt	M1	7/68 (10.3)	1/52 (1.9)			

(續下頁)

(續上頁)

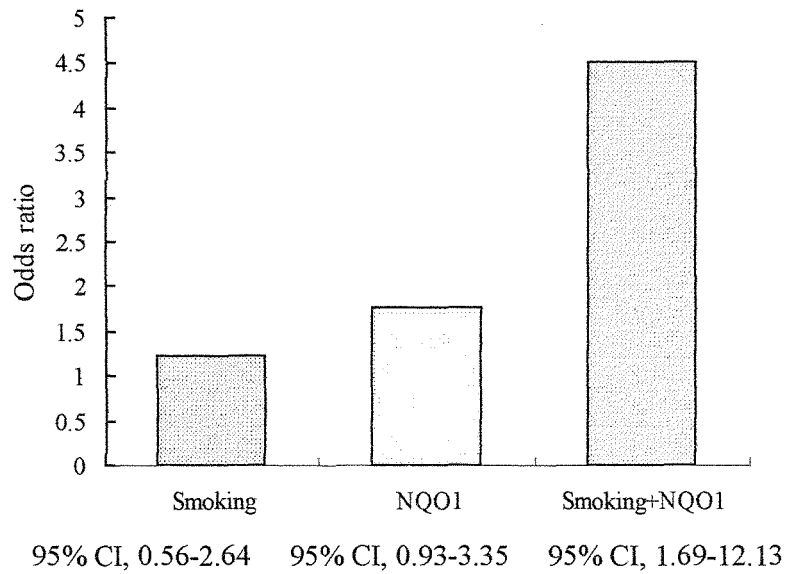
	vt/vt	null	11/68 (16.2)	5/52 (9.6)	1.42 ^d	0.37 - 5.47	0.61
不抽煙	wt/wt + wt/vt	M1	18/41 (43.9)	38/136 (27.9)			
	wt/wt + wt/vt	null	16/41 (39.0)	80/136 (58.8)			
	vt/vt	M1	4/41 (9.8)	8/136 (5.9)			
	vt/vt	null	3/41 (7.3)	10/136 (7.4)	1.05 ^d	0.27 - 4.08	0.95
組織學分類 肺腺癌	wt/wt + wt/vt	M1	27/52 (51.9)				
	wt/wt + wt/vt	null	17/52 (32.7)				
	vt/vt	M1	4/52 (7.7)				
	vt/vt	null	4/52 (7.7)		0.79 ^b	0.23 - 2.68	0.70
肺鱗狀上皮癌	wt/wt + wt/vt	M1	16/47 (34.0)				
	wt/wt + wt/vt	null	16/47 (34.0)				
	vt/vt	M1	6/47 (12.8)				
	vt/vt	null	9/47 (19.2)		2.28 ^b	0.75 - 6.91	0.15
其他	wt/wt + wt/vt	M1	3/10 (30.0)				
	wt/wt + wt/vt	null	5/10 (50.0)				
	vt/vt	M1	1/10 (10.0)				
	vt/vt	null	1/10 (10.0)				

a. M type CYP1A1 + GSTM1 null vs. the resting individuals

b. adjusted for age, sex and smoke status

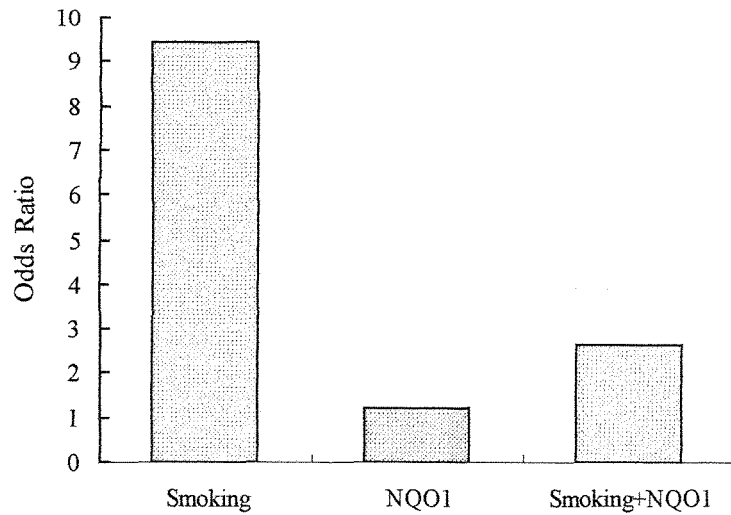
c. adjusted for age and smoke status

d. adjusted for age and sex status



圖一. 肺腺癌之多變項邏輯斯迴歸分析

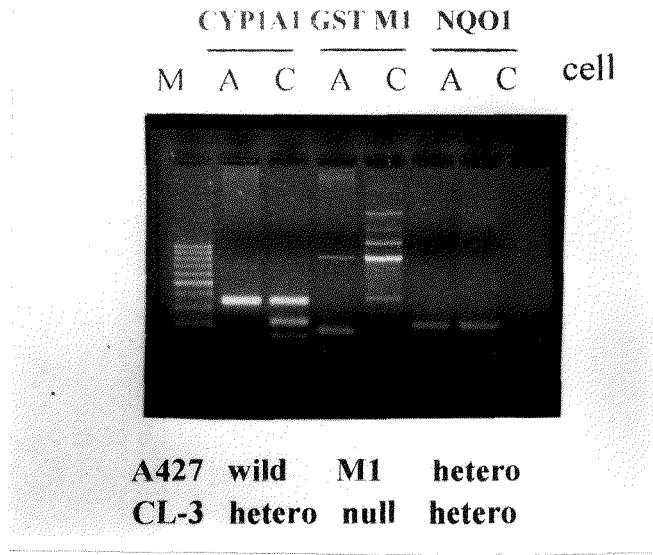
利用多變項邏輯斯迴歸分析，同時控制年齡、性別後，單獨考慮抽煙、wild type NQO1基因型或是帶有wild type NQO1基因型的抽煙者，與肺腺癌的相關性。



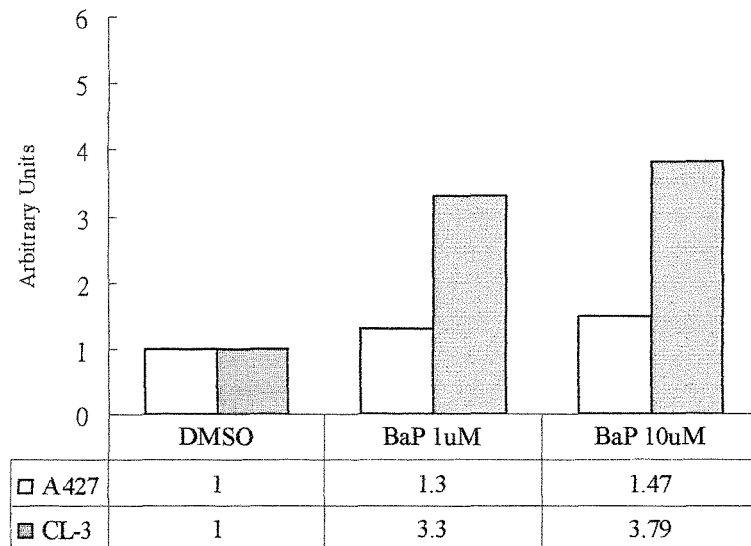
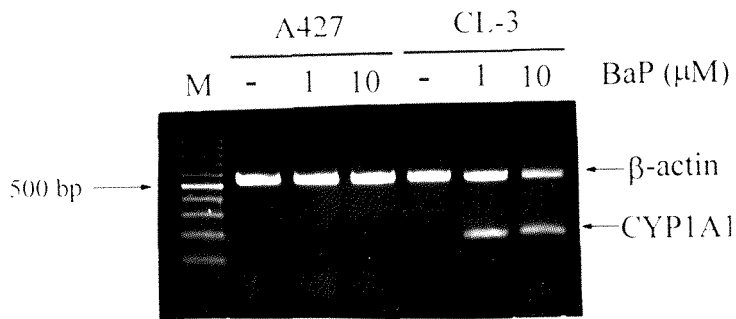
95% CI, 3.61-28.10 95% CI, 0.57-2.58 95% CI, 0.80-8.67

圖二. 肺鱗狀上皮癌之多變項邏輯斯迴歸分析

利用多變項邏輯斯迴歸分析，同時控制年齡、性別後，單獨考慮抽煙、wild type NQO1基因型或是帶有wild type NQO1基因型的抽煙者，與肺鱗狀上皮癌的相關性。

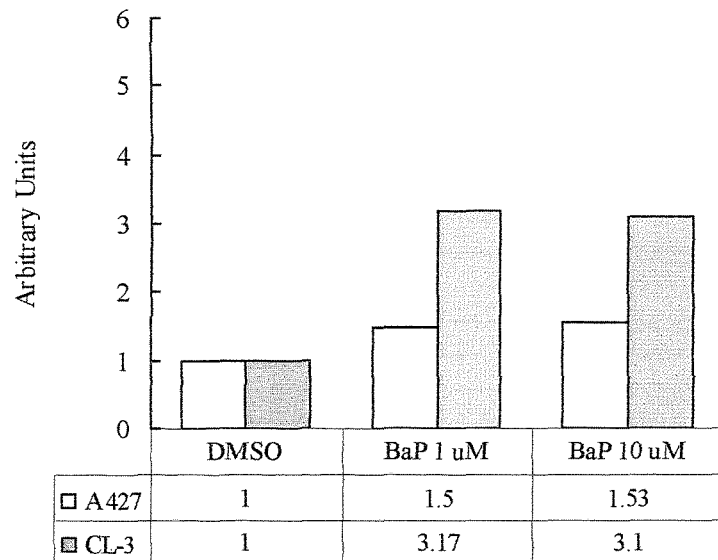
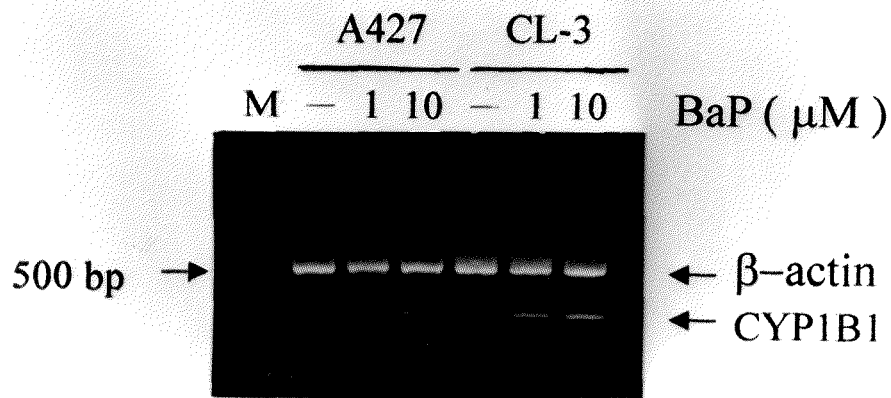


圖三. A427與CL-3肺癌細胞株之CYP1A1, GSTM1, NQO1基因多型態
 A427與CL-3肺癌細胞株抽出DNA後，利用PCR-RFLP確定二細胞株CYP1A1、GSTM1及NQO1之基因型。

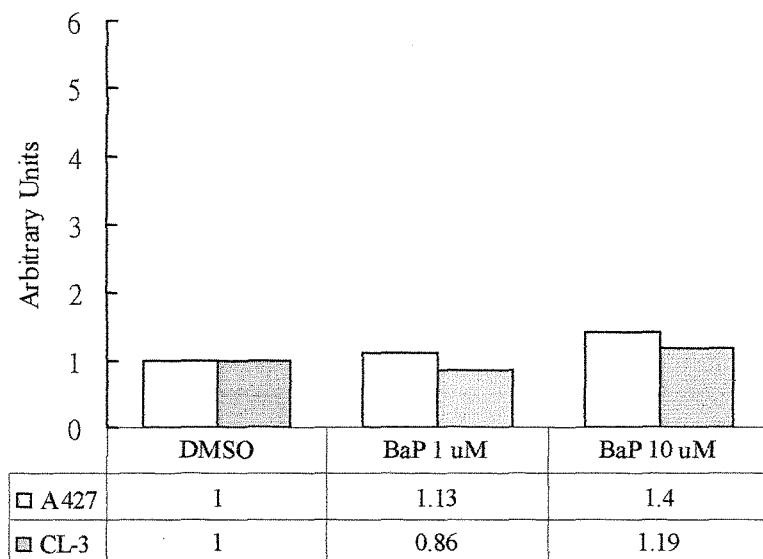
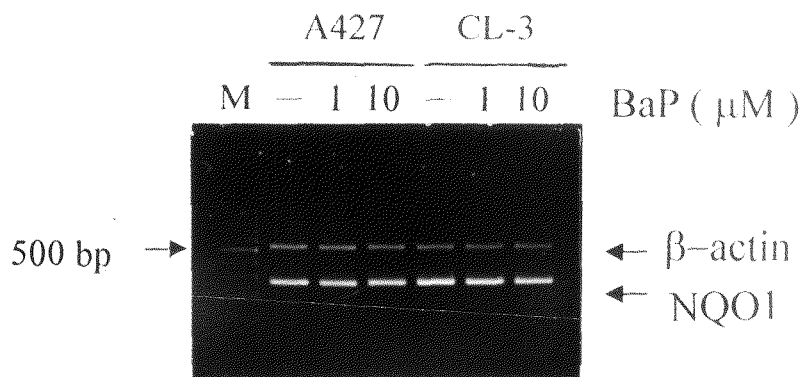


圖四. B[a]P對肺癌細胞株之 CYP1A1 mRNA表現的影響

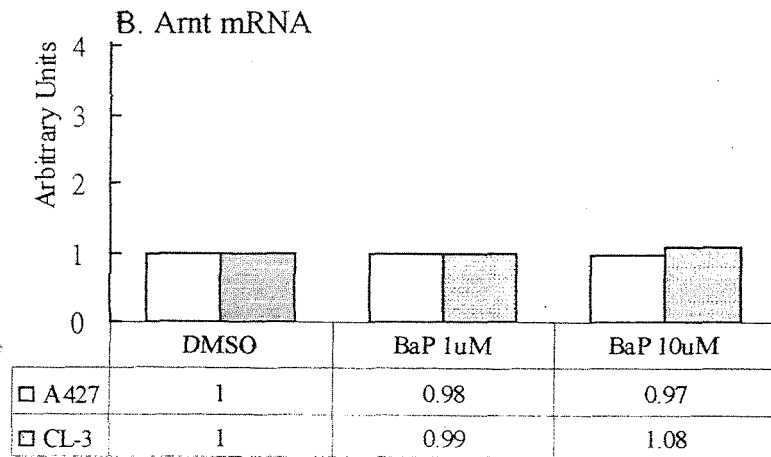
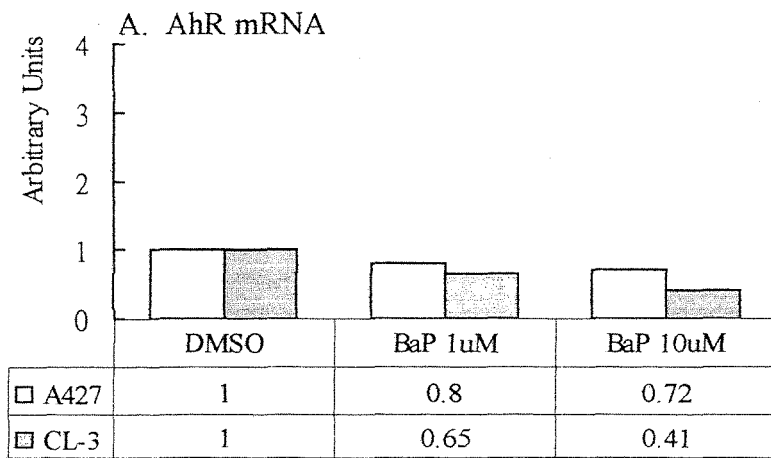
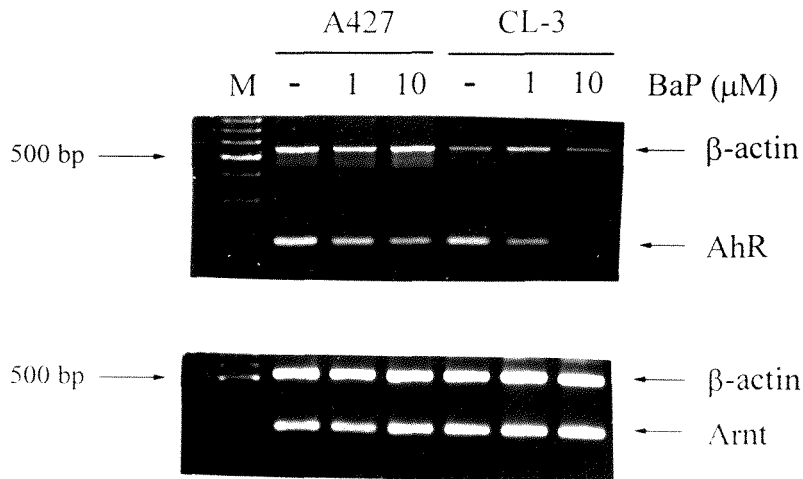
A427及CL-3肺癌細胞株長到八分滿時分別加入DMSO、1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 培養24小時後，抽出RNA經反轉錄成cDNA，再利用PCR放大基因，2% 洋菜膠電泳分離經ethidium bromide 染色後，再以影像分析儀依染色強度定量，每個劑量PCR並以 β -actin為內部定量標準。(三次實驗結果之平均值)



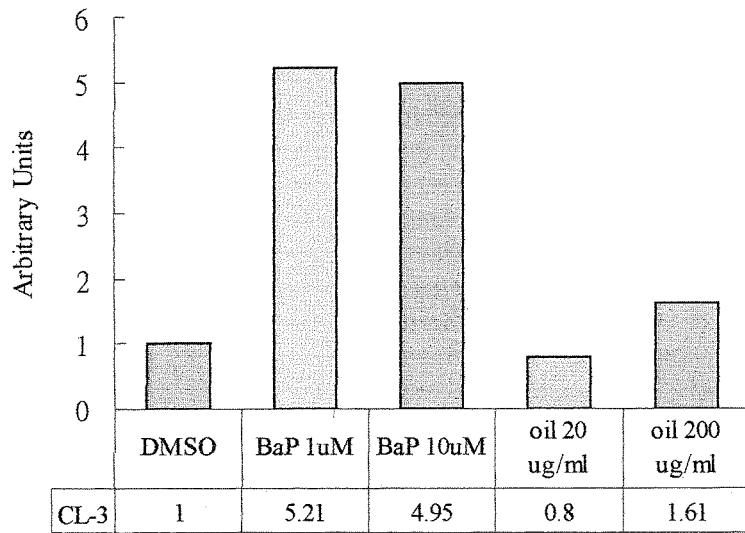
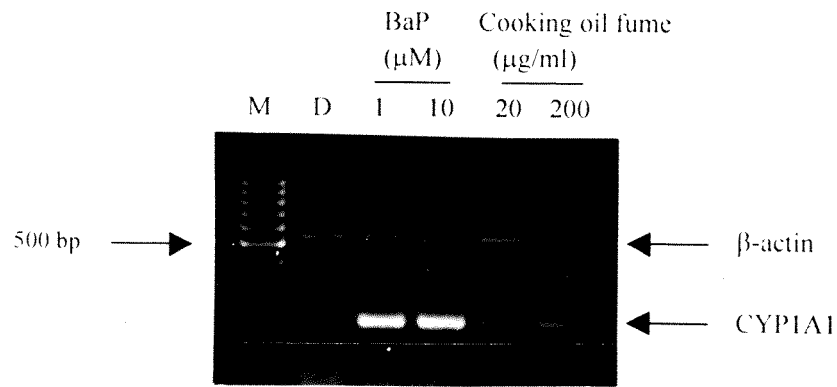
圖五. B[a]P對肺癌細胞株之CYP1B1 mRNA表現的影響
 方法同圖四. (A427 CYP1B1 mRNA 基因表現為二次實驗結果之
 平均值. CL-3 CYP1B1 mRNA基因表現為三次實驗結果之平均
 值.)



圖六. B[a]P對肺癌細胞株之NQO1 mRNA表現的影響
方法同圖四.(三次實驗結果之平均值)



圖七. B[a]P對肺癌細胞株之AhR, Arnt mRNA表現的影響
方法同圖四.(三次實驗結果之平均值.)



圖八. 食用油煙霧(cooking oil fume)對 CL-3 細胞 CYP1A1 mRNA 表現的影響

方法同圖四.

TABLE 1

Summary of Data Specific for Evaluating the Relationship of AHH and CYP1A1 Polymorphisms and Lung Cancer

CYP1A1 polymorphisms and lung cancer							
Location of study	Tissue	Polymorphism	Lung cancer cases (no. [%])	Noncancer controls (no. [%])	Odds ratio ^a (95% CI)	Significance and other endpoints	Ref.
USA	Blood lymphocyte	AHH inducibility					43
		Low	2 (4.0)	38 (44.7)	1.0 (N/A)	$p < 0.01$	
		Intermediate	33 (66.0)	39 (45.9)	16.0 (N/A)	$p < 0.01$	
		High	15 (30.0)	8 (9.4)	36.0 (N/A)	$p < 0.01$	
USA	Blood lymphocyte	AHH Inducibility (ordinal values)	Mean 0.89	Mean 0.47	N/A	t test, $p < 0.001$	44
Italy, Finland	Lung	AHH activity	2-fold (AHH) increased	Control	N/A	N/A	45
		ECOD activity (current smokers)	7-fold (ECOD) increased				46
Japan	Blood lymphocyte	MspI RFLP					54
		m1/m1 (wild type homo)	24 (35.3)	51 (49.0)		OR = 4.6 for Squamous subgroup, $p < 0.01$	
		m1/m2 (hetero)	28 (41.2)	42 (40.4)			
		m2/m2 (mutant homo)	16 (23.5)	11 (10.6)	3.1 (N/A), $p < 0.01$		
Finland	Blood lymphocyte	MspI RFLP					62
		m2 (mutant) allelic freq	22 (13)	28 (12)	NS	NS	
Germany	Blood lymphocyte	MspI RFLP					63
		m2 (mutant) allelic freq	(8.5)	(7.3)	NS	NS	
USA	Blood leukocyte	MspI RFLP					66
		w/m2 or m2/m2 allelic freq	13 (23.2)	15 (31.2)	NS	NS	
Japan	Blood lymphocyte	Ile⇒Val, 462					22
		Ile/Ile (wild type homo)	161 (57.1)	233 (65.1)	0.88 (N/A)	NS	
		Ile/Val (hetero)	87 (30.9)	108 (30.2)	1.02 (N/A)	NS	
		Val/Val (mutant homo)	34 (12.0)	17 (4.7)	2.56 (N/A)	$p < 0.01$	
Germany	Blood lymphocyte	Ile⇒Val, 462					63
		Val (mutant) allelic freq	(6.7)	(3.2)	2.16 (0.96–5.11)	NS	
Brazil	Blood lymphocyte	Ile⇒Val, 462					67
		Ile/Ile (wild type homo)	70 (71)	91 (84)	NS	NS	
		Ile/Val (hetero)	27 (27)	15 (14)	2.38 (1.17–4.84)	$p < 0.01$	
		Val/Val (mutant homo)	2 (2)	2 (2)	NS	NS	
		Ile/Val or Val/Val	29 (29)	17 (16)	2.26 (1.14–4.47)	$p < 0.01$	
Finland	Blood lymphocyte	Ile⇒Val, 462					62
		Val (mutant) allelic freq	12 (7)	13 (5)	NS	NS	

^a Odds ratio is the prevalence of the polymorphism among lung cancer cases, compared with noncancer controls.

^b implies $p < 0.01$; NS = $p > 0.01$.

(Spivack et al. 1997)

TABLE 3
GSTM1 Phenotype and Genotype Related to Lung Cancer

GSTM1 deficiency and lung cancer							
Location of study	Tissue	Polymorphism	Lung cancer cases (N [%w. GSTM1])	Noncancer controls (N [%w. GSTM1])	Odds ratio (95% CI)	Other endpoints	Ref.
USA	Blood lymphocyte	GSTM1 TSO activity	191 (36.7)	192 (58.3)	2.4 (1.6–3.6) $p < 0.0001$	Age, sex, histology nonconfounders	125
USA	Blood lymphocyte	GSTM1 TSO activity	113 (37.0)	120 (42.0)	1.1 (0.3–1.8)	Smoking and non-smoking-related CA examined, other GST activities reported	112
Japan	Blood lymphocyte	GSTM1*0 genotype, PCR	212 (44.4)	358 (53.4)	1.4 (1.1–2.7) $p < 0.05$	Combination genotypes examined	112
UK	Blood lymphocyte	GSTM1*0 genotype-RFLP phenotype-protein-RIA	225 (58.0)	228 (57.0)	1.0 (0.5–1.5)	Histology nonconfounder	136
Germany	Blood lymphocyte, leukocyte	GSTM1 TSO activity; pheno-protein-ELISA; genotype-PCR	117 (47.0)	355 (47.1)	1.0 (0.6–1.7)	Age, sex, histology, smoking nonconfounders	111
Finland	Blood lymphocyte	GSTM1*0 genotype-PCR	138 (47.1)	142 (56.3)	1.5 (0.9–2.3)	Histology (Sq) subset has higher prevalence of GSTM1*0 ($p = 0.01$)	128
USA	Lung	GSTM1 TSO activity; pheno-protein-ELISA; genotype-RFLP	35 (25.7) (25.7) (36.0)	43 (53.5) (53.5) (51.7)	3.3 (1.3–12.5) $p = 0.2$	Smoke dose effect Lung tissue studied Postmortem control tissue, histology do not affect conclusions	129
Japan	Blood lymphocyte	GSTM1*0 genotype-PCR	85 (38.8)	170 (50.6)	1.6 (1.0–2.8) $p = 0.5$	Combined genotypes reported Genotype effect more apparent at low cig dose	131
Sweden	Blood leukocyte	GSTM1 TSO activity; genotype-PCR	296 (44.3)	329 (47.1)	1.1 (0.8–1.6)	Combined genotypes reported Histology (SCC) with some effect	132
Japan	Blood leukocyte	GSTM1*0 genotype-PCR	447 (44.1)	469 (51.4)	1.3 (N/A) $p < 0.05$	Histology, age, gender, cigarette dose reported	127
India	Blood lymphocyte	GSTM1 TSO activity	50 (46.0)	54 (76.0)	3.7 (1.6–8.5) $p < 0.01$	Cigarette dose reported	113
Multinational	Varied	GSTM1 PCR/ELISA/other	1593	2135	1.4 (1.2–1.6) $p < 0.0001$	META-ANALYSIS	133

Note: Reported odds ratios are calculated as the odds of a noncancer control having detectable GSTM1 activity or non-null genotype. Columns 4 and 5 report absolute number of cases (percent GSTM1 sufficient) and controls (GSTM1 sufficient). TSO is *trans*-stilbene oxide activity. ELISA is enzyme-linked immunosorbent assay. PCR is the polymerase chain reaction.

(Spivack et al, 1991)

TABLE 4

The Combined Susceptibility Genotypes That Have Been Reported In Lung Cancer Are Limited to *CYP1A1* m2/m2, *CYP1A1* Val/Val, and *GSTM1*0*

Combined susceptibility genotypes and lung cancer

Location of study	Tissue	Polymorphism (genotype)	Lung cancer cases (N [% susc. genotype])	Noncancer controls (N [% susc. genotype])	Odds ratio (95% CI)	Other endpoints	Ref.
Saitama, Japan	Blood lymphocyte	<i>CYP1A1</i> val/val <i>GSTM1*0</i> combined	212 (8.5)	358 (2.2)	5.8 (2.3–13.3) All 9.1 (3.4–24.4) Sq 3.5 (1.1–10.8) Ad	Susceptible genotype prevalence also reported in non-lung cancers	60 22
Saitama, Japan	Blood lymphocyte	<i>CYP1A1</i> m2/m2 or val/val- <i>GSTM1*0</i> combined	85 (22.4) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (10.6) val/val- <i>GSTM1*0</i>	170 (4.0) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (2.0) val/val- <i>GSTM1*0</i>	16.0 (3.8–68.0) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (low dose) ² 20.0 (3.5–113.6) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (high dose) 41.0 (8.7–193.6) val/val- <i>GSTM1*0</i> (low dose) 27.3 (3.7–200.6) val/val- <i>GSTM1*0</i> (high dose)	Smoking dose reported Only squamous cell data reported Subjects overlap those of Hayashi ^d (61)	148
Yokohama, Japan	Blood leukocyte	<i>CYP1A1</i> m2/m2 or val/val- <i>GSTM1*0</i> combined	97 (23.6) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (9.3) val/val- <i>GSTM1*0</i>	185 (14.6) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> -S ^a (7.1) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> -NS (5.7) val/val- <i>GSTM1*0</i> -S (2.4) val/val- <i>GSTM1*0</i> -NS	8.3 ^a (1.4–49.7) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (low dose) ^c 21.9 (4.7–112.7) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (high dose) N/A ^d N/A N/A ^f	Smoking dose reported Only squamous and small cell data reported	127
Stockholm, Sweden	Blood leukocyte	<i>CYP1A1</i> m2/m2 or val/val- <i>GSTM1*0</i> combined	296 (2.0) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (0.0) val/val- <i>GSTM1*0</i>	329 (0.0) m2/m2- <i>GSTM1*0</i> (0.0) val/val- <i>GSTM1*0</i>		Male-only controls reported Too few combined susceptibility genotypes in this population to analyze	132

Note: Summary data of published studies are included in this table.

^a Ever-smoking status of controls.

^b Smoking dose over a lifetime (cutoff roughly 1 pack per day over 30 years).

^c Smoking dose over a lifetime (cutoff roughly 1 pack per day over 40 years).

^d Only m2/m2 odds ratio (OR) calculated.

^e OR calculated against non-smoking controls (yielding higher ORs).

^f OR not stable as combined *CYP1A1* m2/m2-*GSTM1*0* or *CYP1A1* Val/Val-*GSTM1*0* genotypes are too infrequent in this population for comparison.

(Spivack et al, 1999)

TABLE 1

Frequencies of *CYP1A1* Genotypes and Alleles among Healthy Controls and Lung Cancer Patients in Different Populations

Authors and place of study	Groups	n	<i>CYP1A1</i> genotypes (%)			<i>CYP1A1</i> alleles (%)	
			m1/m1	m1/m2	m2/m2	m1	m2
Nakachi et al., 1991, Japan (45)	Healthy controls	375	44.3	45.1	10.6	0.67	0.33
	Lung cancers	151	40.4	38.4	21.2	0.60	0.40
	SQ	57	33.3	40.4	26.3	0.54	0.46
	SC	24	41.8	29.1	29.1	0.56	0.44
	AD	60	50.3	36.7	13.3	0.68	0.32
Tefre et al., 1991, Norway (41)	Healthy controls	212	78.8	20.3	0.9	0.89	0.11
	Lung cancers	221	77.8	21.3	0.9	0.88	0.12
	SQ	80	73.8	25.0	1.2	0.86	0.14
	SC	55	81.8	18.2	0.0	0.91	0.09
	AD	46	82.6	17.4	0.0	0.91	0.09
Hirvonen et al., 1992, Finland (42)	Healthy controls	121	78.5	19.8	1.7	0.88	0.12
	Lung cancers	87	74.7	25.3	0.0	0.87	0.13
	SQ	44	68.2	31.8	0.0	0.84	0.16
	SC	7	71.4	28.6	0.0	0.86	0.14
	AD	32	81.2	18.8	0.0	0.91	0.09
Alexandrie et al., 1994, Sweden*	Healthy controls	329	83.9	15.8	0.1	0.92	0.08
	Lung cancers	296	83.8	14.9	1.3	0.91	0.09
	SQ						
	Age < 65	36	72.2	27.8	0.0	0.86	0.14
	Age > 65	71	85.9	11.3	2.8	0.92	0.08
	All	107	81.3	16.8	1.9	0.90	0.10
	SC	58	86.2	3.8	0.0	0.83	0.07
AD	84	84.5	4.3	1.2	0.92	0.08	

* Alexandrie A-K, Ingelman-Sundberg M, Seidegård J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer: a study of host factors in relation to age at onset and histological cancer types. *Carcinogenesis*. 1994;15:1785-1790.

(Rannug et al., 1995)

Risk of lung adenocarcinoma and genetic polymorphism of quinone oxidoreductase in Taiwan

Hsiu-Jen Wang¹, Shu-Li Wang², Kan-Jen Tsai³, Huei Lee¹, Chih-Yi Chen⁴, Pinpin Lin¹

¹Institute of Toxicology and ²Department of Public Health, Chung-Shan Medical and Dental Collage; ³Department of Clinical Laboratories, Chung-Shan Memorial Hospital; ⁴Department of Thoracic Surgery, Veterans General Hospital-Taichung, Taiwan.

Cancer is the leading cause of death in Taiwan, and lung cancer respectively is the leading and second-leading causes of cancer deaths among women and men in Taiwan. Genetic variation in metabolic activation or detoxification enzymes has been associated with the occurrence of lung cancer. Recently, a study demonstrated an association of wild-type NADP(H):quinone oxidoreductase (NQO1) genotype with lung cancer risk after controlling for the effects of age, gender, ethnicity, and smoking status (odds ratio, 1.80; 95% confidence interval, 1.09-2.97; $p = 0.02$; *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.*, 6:87-92, 1997). NADP(H):quinone oxidoreductase (NQO1) enzyme is a cytosolic two electron reductase that was thought to be involved in bioactivation and detoxification of environmental carcinogens. Because heavy environmental pollution was observed in Taiwan in our previous studies, possible association between NQO1 genetic polymorphism and lung cancer risk was examined among 190 controls and 114 lung cancer cases in Taiwan. There were no significant differences in the frequency of wild-type NQO1 among all cases and controls. When controls and cases were stratified according to smoking behavior, a marginal association was found between wild-type NQO1 genotype and lung cancer risk among smokers (odds ratio, 3.66; 95% confidence interval, 1.03-13.60, $p=0.046$). NQO1 genotypes or

smoking alone were not associated with lung adenocarcinoma. Surprisingly, smokers with wild-type NQO1 genotype showed a significantly strong association with the risk of lung adenocarcinoma after adjustment for age and sex (odds ratio, 4.52; 95% confidence interval, 1.69-12.13, $p=0.0027$). However, neither wild-type NQO1 genotype alone, nor its co-presence with smoking made any significant contribution to the risk of squamous cell lung cancer. Therefore, we suggest that NQO1 polymorphism is an important genetic risk factor for lung adenocarcinoma among smokers in Taiwan.

MECHANISM OF RESISTANCE TO BENZO[A]PYRENE IN HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA A427 CELL : FAILURE OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR ACTIVATION

Kang-Wei Chang, Hsiu-Jen Wang, Pinpin Lin Institute of Toxicology, Chung-Shan Medical and Dental Collage, Taichung.

In the present study, we observed differential sensitivity to benzo[a]pyrene (B[a]P) in two human lung adenocarcinoma cell lines, A427 and CL-3 cells. A427 cell was resistant to B[a]P, regarding to anti-proliferation effect. It has been shown that cytochrome P450 IA1 (CYPIA1) involved in bioactivation of B[a]P in nongepatic tissue, and was inducible by B[a]P through activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and heterodimerization between ligand-bound AhR and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). We found that CYPIA1 enzyme activity in CL-3 cells, as determined by aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) method, was higher than that in A427 cells. In addition, both enzyme activity and mRNA levels of CYPIA1 was induced by 24hr exposure to 1 and 10 uM B[a]P in CL-3 cells. However, no induction in CYPIA1 activity and mRNA level was found in A427 cells. Furthermore, we utilized a gel retardation assay to detect AhR activation after B[a]P treatment in both cell lines. B[a]P failed to induce a retarded band with the [³²P]-dioxin responsive element (DRE) in A427 cells, which was induced in B[a]P-treated CL-3 cells. The mRNA levels of AhR and Arnt, as detected with the RT-PCR method, were similar between A427 and CL-3 cells, although B[a]P failed to activate AhR in A427 cells. These results suggested that deficient AhR function in human lung adenocarcinoma A427 cells may contribute to its resistance to B[a]P.