



RRPC89090001(59.P)

八十九年度國科會/環保署科技合作研究計畫 期末報告

總計劃:空氣中氮氧化物(NO_x)之產生及其對生物體健康之影響

子計劃五:空氣或煙霧中 NO_x 致肺纖維細胞 MRC-5
癌化作用機轉之探討(一)

Mechanisms of tumorigenesis in NO_x-exposed human
lung fibroblast cells (一)

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： NSC 89-EPA-Z-040-001

執行期間： 88年07月01日至89年12月31日

個別型計畫： 計畫主持人：王朝鐘

整合型計畫： 總計畫主持人：林仁混
(若為個別型免填) 子計畫主持人：王朝鐘

執行單位： 中山醫學院生物化學研究所

中華民國 90 年 1 月 15 日

目 錄

目錄.....	2
摘要.....	3
第一章 前言.....	4
第二章 文獻探討.....	8
第三章 研究方法.....	10
第四章 時程規劃與實際進度.....	14
第五章 結果與討論.....	16
第六章 對空污防治之具體貢獻及應用之可行性分析...	19
參考文獻.....	20
附錄(自評表，期中及期末報告初稿審查意見回覆 表).....	26

摘 要

內生性 NO 與 DNA 之 interaction 已被証實，而空氣中或煙霧中之氮化物 NO_x 與人類肺纖維細胞 DNA 作用之 DNA 加成物，NO_x 活化 iNOS 產生 NO 之途徑，NO_x 攻擊 DNA 產生之加成物是否存在於抽煙患者，及 NO_x 致肺癌之可能機轉，均尚未被證實。

本研究利用合成之 peroxyxynitrite 與 guanine 反應生成二個主要產物，利用 HPLC 分析為 peak I (RT=17.2 min) 及 peak II (RT=19.1 min)，以 NO_x 處理 MRC-5 細胞及吸煙患者顯示 peak I 不存在，而 peak II 存在於 NO_x 處理之 MRC-5 細胞中，且與 NO_x 濃度成正相關，在吸煙病人之血液中亦發現吸煙程度與 peak II 成正比，顯示 peak II 可為 NO_x 攻擊 DNA 的特異指標。

經製備型 HPLC 收集 peak II 後，經 NMR 及 Mass 分析 peak II 為 8-nitroguanine (8-NO₂-G)，可做為外生性 NO_x 之污染指標。本研究進一步證實 NO_x 攻擊 DNA 之途徑有二，一為外生性 NO_x 直接攻擊 DNA，另一為 NO_x 經由活化 iNOS，產生 NO，與 superoxide 作用產生 peroxyxynitrite 再攻擊 DNA，此可由加入 iNOS inhibitor (N^ω-nitro-L-arginine-methylester, NAME)，仍有 8-NO₂-G 之存在，顯示 NO_x 可不經由內生性 NO 產生直接或經由內生性 NO 間接攻擊 DNA。

本研究也進一步證實外生性 NO_x 在 MRC-5 細胞活化 iNOS 產生 NO 後，經由活化 MEKK-1、JNK 及 p38，但對於活化 Raf/MAPK，則不相關。在加入 NAME inhibitor 後經 NO_x 處理之 MRC-5 細胞 MKK-4 及 JNK-1 磷酸化減少，確認氣體性 NO_x 可經由活化 NF-κB 及 iNOS 產生 NO 後刺激 MEKK-1/JNK/p38 訊息路徑，造成 c-Fos 及 c-Jun 蛋白表現增加，可能與 NO_x 造成 MRC-5 細胞癌化有關，已進一步探討中，另一方面顯示氣體性 NO_x 也造成 p53 磷酸化堆積許多 p53，在癌化作用之角色仍有待探討。

第一章 前言

第一節 NO_x 之重要性

在空氣污染中，氮氧化物 Nitrogen oxides (NO_x)佔有重要的份量，大氣中的氣體分子，氮分子就佔了五分之四，在燃燒時，含氮的有機燃料，與部分空氣中氮化合物如 NO、N₂O、N₂O₃、NO₂、N₂O₄ 及 peroxy nitrite 等。最近的研究已知 NO_x 有各種生理、藥理與毒理的活性。在早期認為 NO_x 為空氣中之外生性污染物，但最近已知 NO_x 尤其是 NO 也是重要的內生性化合物。

最近生物醫學之進步，藥理與生化學加以證實 NO 是一種重要的內生性訊息傳遞物質，可在細胞中合成，具有很強的生物功能如血管的擴張鬆弛，血壓的調控，神經訊息的傳遞，基因的表現等等。有兩件大事可資說明 NO 的重要性，其一為 1993 年的 Science 挑選 NO 為年度風雲分子 (The Molecular of the Year)。另一件事是 1998 年的諾貝爾醫學獎頒給了三位研究 NO 藥理作用之學者，他們是 Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro 及 Ferid Murad。在此值得一提的是瑞典諾貝爾委員會在宣佈得獎人時，特別指出這三位學者對 NO 藥理作用之研究，對空氣污染物之研究也有很重要的貢獻。很顯然的這三位前驅學者已闡明了 NO 在細胞中之藥理作用，至於 NO 及其衍生物之毒理特性及其對生體健康的影響有待我們繼續的探討。

空污中之 NO_x 是一群化合物，這些氮氧化物進入人體呼吸道及肺臟，較為有害的化合物為 NO₂ 及 NO。NO₂ 是很毒氣體，其次 NO 與空氣中之 O₃ 反應也會產生 NO₂。NO₂ 會活化 alveolar macrophages 大量分泌 cytokines, NO 及 free radical, 傷害肺臟及呼吸道，與空氣污染地區產生 asthma like syndrome 有密切關係。另外空氣中的 NO_x 會變成穩定性較高的有害物質，如過氧硝酸乙醯酯 (peroxyacetyl nitrite, PAN)，監測台灣各地區，尤其是工業區空氣中 PAN 之濃度，以及研究其對人體與動物體健康的影響，就成為一個重要的課題。所以今後研究內生性的 NO_x

及外生性 ON 對生物體之健康傷害亦是一個重要題目。NO_x 在環保上之重要性，據研究 NO 及 NO_x 是造成酸雨之主要成員之一，NO 及 NO_x 可與食物中之胺類化合物反應而形成有毒性之亞硝酸基化合物，在香煙(tabacco smoking)中，NO 與 NO_x 可與尼古丁(nornicotine)反應而形成亞硝基胺類化合物(tabacco specific nitrosamines)，這些致癌性之化合物成為環保與生物醫學上之重要課題。

人類接觸 NO 及 NO_x 之總量由兩個因素來定，其一由人類細胞自己合成，其二由環境中之空氣，食物及藥物之攝取來決定。環保的重要工作在於監控空污中外來 NO 及 NO_x 的含量，及如何減少此暴露劑量，更進一步研究防止這些 NO 及 NO_x 對人類及其他生物所造成的傷害。由於 NO 及 NO_x 對生物體的傷害是多方面的，也是多層次的，因此總計劃之擬定也針對多方面的傷害目標來探討。

由上述我們已知，NO_x 是重要的空氣污染物，對生物體可以引起多方面的健康危害，本計劃將研究 NO_x 在環境中的發生情形，及其對各種生物系統如呼吸系統，免疫系統，神經系統，及生殖系統造成的健康危害，同時更利用分子生物學及生物化學的方法來研究 NO_x 對細胞中重要分子如 DNA，RNA，protein 及基因之交互作用，進而在分子層次上闡明其毒理機制。本子計劃為探討空氣或煙霧中 NO_x 致肺纖維細胞癌化作用之機制。

第二節 研究動機

肺癌在臺灣之發生率已居於男性第二,女性第一 (1)，從流病調查顯示抽煙為致肺癌最主要因素 (2,3)，其他如 passive smoking (4)，油炸揮發氣體 (5,6)，烹調及職業上之暴露 (7,8)等亦為致癌之因素，但其致肺癌之分子機能仍待進一步研究。空氣中含有多量之 NO_x，包含 N₂O、NO、NO₂、N₂O₃、N₂O₄ 及 N₂O₅，其中 NO 及 NO₂ 與人類生活息息相關，NO 之存在首先由環境污染物分析，但對人類健康則甚少描述，只有從製造硝酸的工人或暴露於高濃度硝酸之農夫表現的一些症狀，如對鼻之刺激,肺部不適等 (9)，而 NO₂ 則較具毒性，濃度大於 150 ppm 將造成肺水腫及嚴重的肺纖維化，在動物研究中其 LD₅₀ 約為 25 ppm，濃度在 4-20 ppm 將造成動物肺發炎上皮細胞傷害及 brochiolitis (10-13)。NO 及 NO_x

在以前一直被認為僅從燃燒等廢氣產生，是一種體外污染物，最近發現是一種內生性物質，具有許多生物功能如血壓調控，神經訊息，基因表現等 (14-16)，長期暴露 NO 或生物體感染發炎等因素造成體內 NOx 濃度增加，使生物產生基因毒性及許多副作用之研究也不斷被提出 (17,18)。最近有許多研究顯示，NOx 與生物體中蛋白之相互作用扮演著重要的生理角色(19,20)，NO 在生體內可與 superoxide 產生 peroxynitrite (21)，在 cigarette smoke fraction 中也發現 peroxynitrite 的產生(22)，peroxynitrite 已被証實顯示具有神經毒性 (23,24)，上皮細胞傷害(25)及脂質過氧化作用(23)等，peroxynitrite 也被證實為一種 oxidative stress-inducing compound，能造成人類細胞 DNA 傷害(22,26)，但此是否煙霧或空氣污染物中 NOx 造成肺癌之原因，仍未被證實。

空氣或煙霧中 NOx 造成 DNA 傷害，可能經由二種途徑，其一為 NOx 直接攻擊 DNA，另一可能為造成組織傷害活化 iNOS 產生 NO(27,28)與發炎組織之 O₂⁻ 產生 peroxynitrite 攻擊 DNA。由於一半以上人類之癌症與 p53 功能及突變有密切之關係(29,30)，高濃度之 NO 可使 p53 的增加(33-35)及細胞凋謝死亡(33-35)，及細胞癌化(36)，由以上的觀點，空氣或煙霧中之 NOx 活化 iNOS 產生 NO 可能與致肺癌有極大相關性。因此本研究將探討空氣或煙霧之 NOx 直接或間接活化 iNOS 產生 NO 後，攻擊 DNA 之產物，並分析說明吸煙患者血液 DNA 或暴露 NOx 之人類肺纖維細胞存在此 NOx-specific DNA adduct，並進一步探討其對 p53 突變，細胞週期，細胞凋謝死亡及活化細胞核致癌基因之增生作用，以說明 NOx 在致肺癌之角色。

第三節 研究目的

1. NO 及 NOx 本身對人類健康影響已漸被重視，且對許多生物醫學的研究已證明 NO 之生物效應，因此生體中無論外來或內生性之 NO 及 NOx 對健康之影響，應值得重視研究。
2. 多數的研究均集中於內生性 NO 濃度的效應，對於體外污染之 NOx 研究則較少。

3. 從環保署公佈之資料顯示 NO_x 總排放量有逐年增加之趨勢，目前每年均 420,000 公噸，因此 NO 及 NO_x 之污染對健康之影響應加以重視。
4. NO 及 NO_x 已被證實可與 DNA 相互作用，造成 DNA damage，因此極有可能存在 NO_x-specific DNA adduct，此 adduct 無論在致肺癌機轉或鑑識 NO_x 暴露上均有其價值。
5. 甚少研究暴露 NO_x 造成內生性 NO 增加之訊息傳遞路徑與致癌之相關性，本研究值得探討。
6. 本研究亦將證明外生性 NO_x 亦可直接攻擊 DNA，產生 NO_x-specific DNA adduct。
7. 將探討 NO_x 與 cell proliferation 之訊息傳遞路徑與 NO_x 致肺癌機轉之相關性。
8. 本研究也將證實 8-NO₂-G 可為 NO_x 污染(如 smoking)指標。

第四節 預期目標

1. 確認 NO_x 與 DNA interaction 之可能機轉可能透過內生性之 NO 作用。
2. 提出 NO_x 也可直接與 DNA 作用之證據。
3. 提出 NO-specific DNA adduct 可做為 NO_x 污染之指標，及健康之評估。
4. 證明吸煙者血液中含有 NO_x-specific DNA adduct，並說明香煙煙霧之 NO_x 可能為致肺癌主因。
5. 提出 NO_x 污染經由 MAPK kinase cascade 活化 iNOS，增加內生性 NO 濃度，可直接或間接造成 DNA damage；*p53 促進磷酸化與癌化關係；+促進細胞增生之 signal pathway。
6. 提出 NO_x 活化細胞核 protooncogenes 造成增生與癌化之關係。

第二章 文獻探討

肺癌在臺灣之發生率已居於男性第二,女性第一 (1), 從流病調查顯示抽煙為致肺癌最主要因素 (2,3), 其他如 passive smoking (4), 油炸揮發氣體 (5,6), 烹調及職業上之暴露 (7,8)等亦為致癌之因素, 但其致肺癌之分子機能仍待進一步研究。空氣中含有多量之 NOx, 包含 N₂O、NO、NO₂、N₂O₃、N₂O₄ 及 N₂O₅, 其中 NO 及 NO₂ 與人類生活息息相關, NO 之存在首先由環境污染物分析, 但對人類健康則甚少描述, 只有從製造硝酸的工人或暴露於高濃度硝酸之農夫表現的一些症狀, 如對鼻之刺激, 肺部不適等 (9), 而 NO₂ 則較具毒性, 濃度大於 150 ppm 將造成肺水腫及嚴重的肺纖維化, 在動物研究中其 LD₅₀ 約為 25 ppm, 濃度在 4-20 ppm 將造成動物肺發炎上皮細胞傷害及 bronchiolitis (10-13)。NO 及 NOx 在以前一直被認為僅從燃燒等廢氣產生, 是一種體外污染物, 最近發現是一種內生性物質, 具有許多生物功能如血壓調控, 神經訊息, 基因表現等 (14-16), 長期暴露 NO 或生物體感染發炎等因素造成體內 NOx 濃度增加, 使生物產生基因毒性及許多副作用之研究也不斷被提出 (17,18)。最近有許多研究顯示, NOx 與生物體中蛋白之相互作用扮演著重要的生理角色(19,20), NO 在生體內可與 superoxide 產生 peroxynitrite (21), 在 cigarette smoke fraction 中也發現 peroxynitrite 的產生(22), peroxynitrite 已被證實顯示具有神經毒性 (23,24), 上皮細胞傷害(25)及脂質過氧化作用(23)等, peroxynitrite 也被證實為一種 oxidative stress-inducing compound, 能造成人類細胞 DNA 傷害(22,26), 但此是否煙霧或空氣污染物中 NOx 造成肺癌之原因, 仍未被證實。

p53 參與細胞之多重功能, 包括基因轉錄, 修補, 細胞週期, 凋謝死亡等(27-29), 過去的報告已顯示高濃度的 NO 造成 wild type p53 之增加(30-31)及凋謝死亡 (30,32-33), 許多人類癌症之發生也大部分與 p53 突變有關(34-36), 上述的研究多

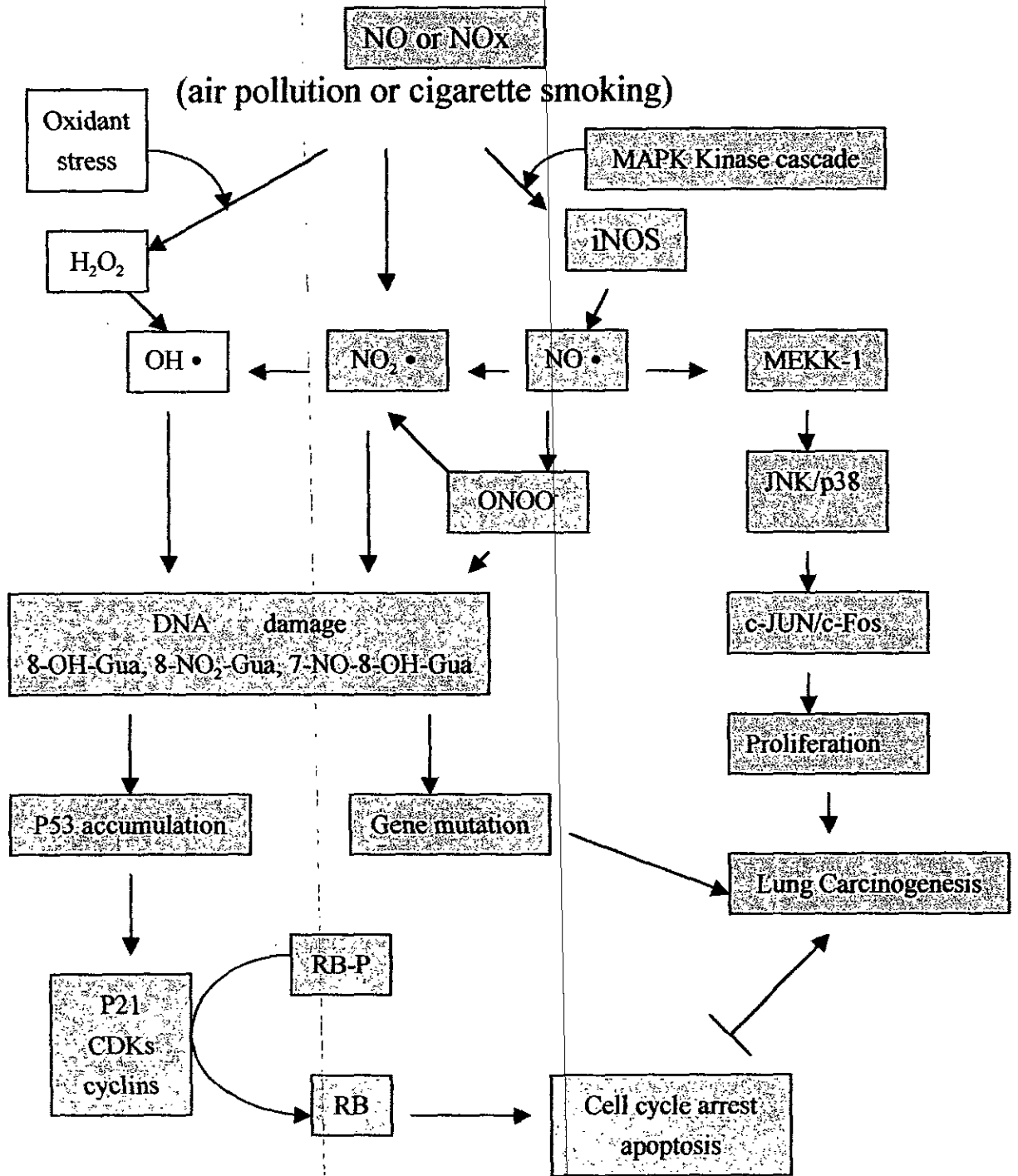
著重於內生性之 NO，相關之研究在空氣污染中，尤其是煙霧之 NO 及 NO_x 則甚少報告，但 NO₂ 造成 DNA damage 已被發現(37)，NO₂ 也造成活化膜蛋白及 PKC(38)，且 NO₂ 較 NO 更具活性(39,40)。

由以上的文獻探討，我們推想空氣污染中之 NO 及 NO_x(外生性)，因造成組織之發炎，也可能誘導 iNOS 產生 NO(內生性)，均將造成與 DNA 之 interaction，而影響 target 基因(如 p53)之功能，可能在致肺癌中扮演重要角色。

另一種途徑，也可能由於外生性 NO_x 造成細胞核致癌基因表現增加，可能也在致癌上扮演重要角色。

第三章 研究方法

第一節 研究架構



污染性 NOx 直接或間接活化 iNOS 產生 NO[•] 致肺癌之可能途徑，格內黑影部分為本研究所探討路徑。

第二節 研究方法

(一) Peroxynitrite 製備及鑑定

Peroxynitrite 之致被係根據 Beckman 等(41)方法，加以修飾，其製備其中 NaNO_2 (0.6 M) / H_2O_2 (0.7 M) 及 NaOH (1.5 M)， NaNO_2 及 $\text{HCl} / \text{H}_2\text{O}_2$ 先以 pump (26 ml/min) 混合後再以相同流速混合 NaOH ，以 MnO_2 破壞過剩之 H_2O_2 ，產生之上層黃色部分經冷凍乾燥即可得 peroxynitrite，其 λ_{max} 為 302nm， $\epsilon_{302}=1670\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

(二) NO_x 與 DNA 相互作用

(A) 標準 NO_x -specific DNA adduct 之合成

3 ml 之 50 mM peroxynitrite 及 2 mg guanine 於 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 中反應，以 HCl 中和，產物經 Slica gel F_{254} 分離，以 25% ammonium 飽和之 n-butanol 為展開液，以 UV 偵測。

(B) HPLC 分析

以 Millex-HV / 3 filter (0.45 μm) 過濾，經 Nucleosil C18 (5 μ) column 分離，mobil phase 為 20 mM ammonium formate buffer，pH 6.0，flow rate 為 2 ml/min，Dector 為 254 nm。

(C) NO_x -specific DNA adduct 鑑定

以製備型 HPLC，ODS column (5 μ ，4.6 mm x 15 cm) flow rate 0.8 ml/min，mobil phase 同上，收集各 peak fractions，以 NMR，Mass，IR 分析其結構。

(三) MRC-5 細胞暴露 NO_x 後，及吸煙者血液中 DNA adduct 濃度分析

將人類肺纖維細胞置於經 NO 及 NO_2 (0、25、50、100、200、500 ppm) 混合氣體飽和之培養基中培養後，收集細胞，以 chloroform/isoamylalcohol (24: 1) 萃取 DNA，酒精沈澱，再以 Tris-EDTA buffer (pH 8.0) 及 RNase A (100°C，加熱 15 分鐘)，在 65°C 加熱 1 小時再以 phenol/chloroform 萃取及酒精沈澱

DNA，根據 Frenkel's 等(42)方法，以 nuclease P1 水解後，再以 alkaline phosphatase 水解，以 HPLC 分析 NO_x-specific DNA adduct 之濃度，HPLC 分析方法及條件同上。NO 濃度之分析則利用 Griess reagent。另收得吸煙不同者之血液，分離 DNA 後，同上方法水解，以 HPLC 分析。

(四) NO_x 暴露後之 MRC-5 細胞 p53 基因序列分析

MRC-5 細胞經 gaseous NO solution 處理後，其 p53 序列分析，依下列步驟：(A) 抽取 DNA；(B) 引子(primer)合成，由快興科技公司訂製其鹼基順序如表一；(C) PCR 條件如表二；(D) PCR 產物經純化後利用 USB 之 sequencing kit 分析定序。

附表一：Sequencing of the oligonucleotides for PCR and direct sequence analysis

Exons	Primers	5'end	3'end	size
5	5-1	TGTTCACTTGTGCCCTGACT		217
	5-3	AGCAATCAGTGAGGAATCAG		
6	6-1	TGGTTGCCCAGGGTCCCCAG		130
	6-2	TGGAGGGCCACTGACAACCA		
7	53-7	CTTGCCACAGGTCTCCCCAA		98
	7-1	AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA		
8	8-1	TTGGGAGTAGATGGAGCCT		135
	8-3	AGTGTTAGACTGGAACTTT		

附表二：Polymerase chain reaction conditions for detection of the point mutation of p53 gene

Exons	primer	Denature		anneal		Extension		Cycle
P53		°C	"	°C	"	°C	"	No.
5	5-1, 5-3	94	60	58	60	72	120	35
6	6-1, 6-2	94	60	56	60	72	120	35

7	53-7, 7-1	94	60	54	60	72	120	35
8	8-1, 8-3	94	60	54	60	72	120	35

(五) Western blotting 分析

經 NOx (25-500 ppm) 暴露後之 MRC-5 細胞，置於 buffer A (20 mM Tris-HCl pH7.4, EDTA 2 mM, glycerol 10%, sucrose 0.33 M, μ -mercaptoethanol 50 mM, PMSF 2 mM 及 leupeptin 25 μ g/ml) 以均質機研磨，取 100 μ g 蛋白量之均質液，加入等體積之 protein loading buffer，混合均勻，loading 至 10% SDS-PAGE，電泳完成後，以 4°C，100 mA 轉漬蛋白，進入含 3% 胎牛血清之 TBST buffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0.1%) 於室溫下搖動 2 小時，加 antibody 作用 3.5 hr，再以 TBST 清洗三次後與 secondary Ab (0.2 μ g/ml) 反應 1 小時，以 TBST 清洗，浸入受質緩衝液 (含 BCIP, NBT) 進行呈色反應，約 10-30 分鐘，直至色帶出現。

(六) NAME (iNOS inhibitor) 對 NOx 產生 DNA damage 及 signal proteins 之影響

為證明 NOx 致肺病變一部份來自誘發內生性 NO 之作用，在上述的實驗中，加入 iNOS 抑制劑 NAME (抑制 NO 產生)，然後分析 8-NO₂-G 的產生及其利用上述 Western blotting 分析 signal proteins 之影響。

第二節 實際進度說明

1. 已完成 peroxy nitrite 之製備及特性分析(圖一，圖二，及圖三)
2. 已完成 NO_x-specific DNA adduct 之製備及鑑定(圖四)為 8-NO₂-G。
3. 細胞暴露 NO_x 不同時間及不同劑量產生 8-NO₂-G 之相關性(圖五、六)
4. 加入 iNOS inhibitor (NAME)或直接以 NO_x 與 MRC-5 細胞抽取之 DNA 反應，均有 8-NO₂-G 之產生，顯示 NO_x 可直接與 DNA 作用(圖七、八及九)。
5. NO_x 在 cell free 及 MRC-5 細胞中，均可在 medium 產生 nitrite，但在 MRC-5 細胞中產生較多 nitrite，顯示氣體性 NO 可直接或活化細胞 iNOS 產生(圖十)。
6. 完成不同程度吸煙者血液 DNA 中 8-NO₂-G 含量分析(圖十一)，顯示不同程度吸煙者與血液 DNA 中 8-NO₂-G 成相關。
7. 完成氣體性 NO_x 活化 MRC-5 細胞 NF-κB 及 iNOS 產生 NO 之途徑(圖十二 A、B)。
8. 氣體性 NO_x 經由活化 iNOS 產生 NO，再活化 MEKK-1/MKK-4 及 JNK、p38(圖十四 A、B、C)，促使 c-Fos 及 c-Jun 表現增加(圖十六)，但不經由 Raf/MEK 途徑(圖十三)。
9. 以 NAME 處理發現 MKK-4-p 及 JNK-p 減少(圖十五 A、B)確認氣體性 NO_x 經由 MEKK-1 及 MKK-4 路徑，促進增生。
10. 氣體性 NO_x 也造成 p53 增加及 phosphorylation(圖十七)，但並未造成 p53 mutation。

第五章 結果與討論

第一節 結果

1. Peroxynitrite 之製備與特性

圖一顯示以 0.6 M NaNO₂ 及 0.6 M H₂O₂ 在 0.7 M HCl 作用之裝置圖，生成之 peyoxynitrite 其吸收光波長為 302 nm(圖二)

$$\epsilon_{302}=1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}。$$

2. NO_x-specific DNA adduct 之製備及鑑定

利用 guanine 與 peroxynitrite 反應，形成一吸收光波長之反應物(圖三)，經 HPLC 分離為兩個產物，RT 為 17.2 及 19.1 min(圖四)，經由製備型 HPLC 收得，Mass 光譜為圖四，peakII 經鑑定為 8-NO₂-G。

3. 證明 8-NO₂-G 存在於 NO_x 處理之 MRC-5 細胞

暴露於 NO_x 之 MRC-5 細胞之 8-NO₂-G 之濃度以 NO_x 50 μM 處理 MRC-5 細胞，6、12、24 及 48 hr，經 HPLC 分析，顯示 8-NO₂-G 之存在，且具有 time-dependent(圖六)，以不同濃度 NO_x (10、20、30、50 及 100 μM) 處理 MRC-5 細胞 48 hr，亦顯示 8-NO₂-G 產生，且有 dose-response(圖五)。

4. 證明 NO_x 攻擊 DNA 是直接或誘導產生 NO 攻擊 DNA ?

利用 iNOS 抑制劑 N^w-nitro-L-arginine-methylester (NAME) 抑制 NO 產生，發現 NO_x 處理之 MRC-5 細胞，產生之 8-NO₂-G 減少，但仍有約 35% 存在，另一方面，直接由 MRC-5 細胞抽取之 DNA，與 NO_x 反應 48 hr 後，也有 8-NO₂-G 之生成，且生成之濃度與 NO_x 濃度成正比(圖七)，顯示 NO_x 攻擊 DNA 係經由部份 NO_x 及部份誘生性之 NO 共同作用(圖七、八及九)。

5. 吸煙患者與肺癌之 8-NO₂-G 濃度

由不同程度吸煙患者分析其血液中 DNA 含有 8-NO₂-G (圖十一)之存在，其濃度與吸煙程度成正比，顯示煙霧中 NO 及 NO_x 對人體產生基因毒性，可能

為致肺癌之主因。

6. iNOS 及 NF- κ B 蛋白量之表現

經由 50 μ M 之 NO_x 處理 MRC-5 細胞，顯示 iNOS 及 NF- κ B 蛋白隨著時間增加而顯著增加(圖十二)，以不同濃度 NO_x 處理 MRC-5 細胞 48 hr，也顯示此二蛋白表現與 NO_x 濃度有 dose-response 關係，因此證明 NO_x 可經由 NF- κ B 活化 iNOS 產生 NO。

7. MAPK Kinase 之蛋白表現

以 50 μ M NO_x 處理 MRC-5 細胞 48 hr，顯示 MRC-5 細胞 Raf 及 Erk 蛋白均無表現，但 A431 細胞有表現(positive control)，(圖十三)，但在 12 hr 時 MEKK 1 及 JNK 1 有最大表現(圖十四)，且以不同濃度之 NO_x (10-100 μ M)處理 MRC-5 細胞 12 hr，也顯示 MEKK-1 及 JNK 1/2 有劑量相關性，進一步以 JNK phosphorylation 程度，顯示 JNK 被 NO_x 活化，因此初步的結果顯示，污染性 NO_x 經由 MEKK-1，JNK/JNK，NF- κ B 活化 iNOS 產生 NO，但不經由活化 Raf/MAPK 路徑。以 NAME 處理 MRC-5 細胞，顯示 MKK-4 及 JNK-1 phosphorylation 減少(圖十五)，確認氣體性 NO_x 活化 MEKK-1/JNK/p38 途徑。

8. NO_x 處理 MRC-5 細胞也造成細胞核原致癌基因 c-Jun 及 c-Fos 表現增加(圖十六)，可能與 NO_x 致癌相關。

9. NO_x 處理 MRC-5 細胞造成 p53 磷酸化及堆積 p53(圖十七)，但並未造成 p53 突變，此現象於 NO_x 細胞癌化之關係，仍待探討。

第二節 討論

本研究合成分離純化及鑑定 8-NO₂-G，並發現 NO_x 暴露於 MRC-5 細胞，MRC-5 細胞 DNA 及抽煙者血液均有 dose- 及 time- dependent 之關係(圖 5, 6, 9, 11)，確認 8-NO₂-G 可做為 NO_x 污染之生物指標。此 8-NO₂-G 的生成係經由 NO_x 直接或活化 iNOS 產生內生性 NO 後攻擊 DNA(圖 7-9)。過去的研究已顯示 8-NO₂-G

之形成係經由 peroxynitrite 攻擊 DNA (22, 26)，而本研究證實除了此途徑外，以 DNA (分離自 MRC-5 細胞) 直接與 NO_x 作用也可以產生，此結果可由 NAME (iNOS 抑制劑) 只有部分抑制 NO_x 暴露 MRC-5 細胞產生之 8-NO₂-G 之證據 (圖 7) 所支持。因此本研究我們提出 8-NO₂-G 的產生是由細胞 peroxynitrite (由 superoxide 與 NO 作用產生) 攻擊 DNA，另一由 NO_x 直接攻擊 guanine 之 C-8 產生。

NO_x 廣存於空氣及煙霧中 (43-45)，在煙霧中 NO 支濃度每支香煙超過 600 μg (46)。NO_x 中之 NO 也來自 NOS，在人體肺之 airway epithelial 細胞中存在表現 eNOS，可增加產生 NO (47-49)。8-Hydroxyeoxguanosine (8-OH-dG) 是一個氧化傷害 DNA 之指標 (50-54)，但至目前為止並未有報告指出 NO_x 對 DNA 傷害特異性之指標，研究結果首次提出 8-NO₂-G 為 NO_x 造成 DNA 傷害之特異性之生物指標。此 DNA 在 C-8 位置之 nitration，可能造成 DNA 上 apurinic sites 之 depurination (55)，進一步行成 G:C T:A transversions。因此 8-NO₂-G 之產生可能與肺癌致病扮演重要角色。

本研究也進一步證實氣體性 NO_x 在 MRC-5 細胞中活化 iNOS 產生 NO 後，再經由活化 MEKK-1、JNK 及 p38 蛋白激酶，但並非為活化 Raf/MAPK 路徑，加入 NAME 後 MKK-4 及 JNK-1 磷酸化減少，確認 NO_x 經由活化 NF-κB 及 iNOS 產生 NO 後活化 JNK/p38 訊息路徑，造成 c-Fos 及 c-Jun 蛋白表現增加。(圖 12-16)，經過這些結果我們提出氣體性 NO_x 活化 iNOS 產生 NO 再活化 JNK/p38 mitogenic pathway，增加致癌基因 c-Fos 及 c-Jun 表現，造成增生，此可能為 NO_x 致肺癌的另一途徑。過去研究已證實 NO_x 活化 p21 Ras 促進 NF-κB 活化 (56)，最近進一步證實 NO_x 活化 Jurket T 細胞 ERK，P38 及 JNK (57)，但是我們的結果顯示在 MRC-5 細胞並未活化 Raf/ERK，而是經由 MEKK-1/JNK，可能是由不同細胞 (Jurket T 細胞及 MRC-5 細胞) 經由不同的活化路徑。利用 iNOS 抑制劑 NAME 也清楚的顯示 MKK-1 及 JNK-1 磷酸化被抑制，更證實了 NO_x 活化 JNK/p38 係經由 NO 產生。細胞原致癌基因，如 c-Fos, c-Jun 已被發現與增生及發炎有關 (58,

59)，本研究也顯示氣體性 NO_x 也增加了 c-Fos 及 c-Jun 表現，此現象可能造成 MRC-5 細胞增生，此可能與 NO_x 癌化相關，進一步的探討正在進行中。

綜合以上結果顯示 NO_x 能直接或活化 iNOS 產生 NO 攻擊 DNA 形成 8-NO₂-G；及活化 MEKK-1/JNK mitogenic 訊息路徑，促進 proto-oncogenes 增加表現，可能都是空氣或煙霧污染致肺癌過程之一。

第六章 對空污防治之具體貢獻及應用之可行性分析

(I) 本研究在空污防治之重要成效為：

1. 建立空氣中 NOx 汙染所造成之基因毒性指標為 8-NO₂-G。
說明：a. 以 NOx 不同濃度處理 MRC-5 細胞，其 8-NO₂-G 與 NOx 成正相關。
b. 以抽煙者血液 DNA 分析 8-NO₂-G 含量與吸煙量成正比。
2. 確立空氣中 NOx 致肺纖維細胞增生經由活化 MEKK-1/JNK-1/p38 signaling 途徑，可能與空氣中 NOx 致肺病變相關。
3. 說明空氣中 NOx 致肺病變或肺癌與產生 genotoxic 及活化 signaling proteins 有關。

(II) 在空污防治之應用可行性

1. 本研究研發出 8-NO₂-G 之製備、之分離及分析，可利用 HPLC-ECD 分析暴露高危險群（如交通警察、硝酸工廠操作員、火力發電廠、煉鋼廠員工及抽煙和二手菸之人）之基因毒性分析（本部分若有經費補助既可進行研究）
2. 利用 HPLD-ECD 分析 8-NO₂-G 較費時非一般研究室可進行，若有經費補助，希望能製備 8-NO₂-G 抗體，發展 ELISA 方法。

參考文獻

1. Department of Health, The Executive Yuan. Republic of China: General health statistics, pp.88-111, In: Health and Vital Statistics, Republic of China, Taipei, Taiwan, R.O.C. Press, 1996.
2. Yu, S.Z. and Zhao, N (1996) Combined analysis of case-control studies of smoking and lung cancer in China, *Lung Cancer*, 14, S161-S170.
3. Ger, L.P., Hsu, W.L., Chen, K.T. and Chen, C.J. (1993) Risk factor of lung cancer by histological category in Taiwan, *Anticancer Res.*, 13, 1491-1500.
4. Wen, C.P., Tsai, S.P. and Yen, D.D. (1994) The health impact of cigarette smoking in Taiwan. *Asia Pacific. J. Public health*, 7, 206-213.
5. Gao, Y.T. (1996) Risk factor for lung cancer among nonsmokers with emphasis on lifestyle factors. *Lung Cancer*, 14, S39-S45.
6. Shields, P. G., Xu, G. X., Blot, W.J., Frumeni, F., Trivers, G. E., Pellizzari, E. D., Qu, Y. H., gao, Y. T. and Harris, C. C. (1995) Mutagens from heated Chinese and U. S. cooking oils. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 836-841.
7. Koo, L.C. and Ho, J. H-C. (1996) Diet as a confounder of the association between air pollution and female lung cancer. Hong kong studies on exposures to environmental tobacco smoke, incense, and cooking fumes as examples. *Lung Cancer*, 14, S47-S61.
8. Chen, R., Wei, L. and Chen, R.L. (1995) Lung cancer mortality update and prevalence of smoking among cooper miners and smelters. *Scand. J. Work Environ. Health*, 21, 513-516.
9. Oda, H., Nogami, H., Kusumoto, S., Nakajima, T., and Kurata, A. (1980) Lifetime exposure to 2.4 ppm nitric oxide in mice. *Environ. Res.*, 22, 254-263.
10. Morrow, P.E. (1984) Toxicological data on NO₂: an overview. *J. Toxicol. Environ. Health*, 13, 205-227.
11. Juhos, L.T., Green D.P., Furiosi, N.J. and freeman, G. (1980) A quantitative

- study of stenosis in respiratory bronchiole of the rat in NO₂-induced emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 121, 541-549.
12. Graop, J.D., Barry, B.E., Chang, L.Y. and Hercer, R.R. (1984) Alterations in lung structure caused by inhibition of oxidants. *J. Toxicol. Environ. Health*, 13, 301-321.
 13. Laste, J.A., Gelzleichter, T.R., Pinkerton, K.E., Walker, R.M. and Witschi, H. (1993) A new model of progressive pulmonary fibrosis in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148, 487-494.
 14. Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1995) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 175-195.
 15. Zhang, J. and Snyder, S. H. (1994) Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35, 213-233.
 16. Rodeberg, D.A., Cheat, M.S. and Garcia, V.F. (1995) Nitric oxide: an overview. *Am. J. Sugar*, 170, 292-303.
 17. Liu, R.H. and Hotchkiss, J.H. (1995) potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mut. Res.*, 339, 73-89.
 18. Victorin, K. (1994) Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mut Rrs.*, 317, 43-55.
 19. Stamler, J.S., Simon, D.L. and Loscalzo, J. (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 444-448.
 20. Stamler, J.S., Single, D.J. and Loscalza, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 1898-1902.
 21. Prtor, W.A. and Squadrito, G. L. (1995) The Chemistry of peroxynitrite. A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.*, 268, L699-L722.
 22. Muller, T., Haussmann, H-J. and Schepers, G. (1997) Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis*, 18, 295-301.

23. Choi, D. (1993) Nitric oxide: foe or friend to the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 9741-9743.
24. Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Sizing, Z.L., Chen, H.S.V., Sucher, N. J. and Stamler, J.S. (1993) a redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364, 626-632.
25. Beckman, J.A., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxy radical production: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1620-1624.
26. Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M. and Nagata, C. (1995) Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, 314, 62-64.
27. Harris, C.C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88, 1442-1445.
28. Ko, L.J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm, *Genes and Dev.*, 10, 1054-1072.
29. Gottlieb, T. M. and Oren, M. (1996) p53 in growth control and neoplasia. *Biochem. Biophys. Acta*, 1287, 77-102.
30. Messmer, U. K., Ankarcona, M., Nicotera, P. and Brune, B. (1994) p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.*, 355, 23-26.
31. Forrester, K., Ambs, S. and Harris, C.C. (1996) Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2442-2447.
32. Fehsel, K., Kroncke, K. D. and Kolb-Bachofen, V. (1995) Nitric oxide induce apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.*, 155, 2858-2865.
33. Geng, Y.J., Wennmalm, A. and Hansson, G.K. (1996) Apoptotic death of human Leukemic cells induced by vascular expressing nitric oxide synthase

- in response to gamma-interferon. *Cancer Res.*, 56, 866-874.
34. Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M. and Harris, C. C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation, *Nucleic Acid Res.*, 24, 141-146.
 35. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991) p53 mutation in human cancer. *Science*, 253, 49-53.
 36. Levine, A.J., Momand, J. and Finlay, C.A. (1991) The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 351, 453-456.
 37. Gorsdorf, S. Apple, K.E. and Obe, G. (1990) Nitrogen dioxide induce DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis*, 11, 7-41.
 38. Li, Y.D., Patel, J.M. and Block, E.R. (1994) Nitrogen dioxide-induced phosphatidylserine biosynthesis and subcellular translocation in cultured pulmonary artery endothelia cells. *Toxicol. Appl. Phaemacol.*, 129, 114-220.
 39. Pryor, W.A. and Lightsey, W. (1981) Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science*, 214, 435-437.
 40. Pryor, W.A. and Church, D.F. (1982) Reaction of nitrogen dioxide with mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 6685-6692.
 41. Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos. H. and Crow, J. P. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.*, 233, 229-240.
 42. Frenkle, K., and Solomon, J.J., (1991) Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo. *Anal. Biochem.*, 196, 126-136.
 43. Last, J.A., Sun, W.M. and Wistschi, H. (1994) Ozone, NO and NO₂ oxidation air pollutants and more. *Environ. Health Perspect.*, 102 (suppl), 179-184.
 44. Mobsenin, V. (1994) Human exposure to oxides of nitrogen at ambient and supra-ambient conceration. *Toxicol.*, 89, 301-312.

45. Church, C.F. and Pryor, W.A. (1985) Free radical Chemistry of cigarette smoke and its toxicological implication. *Environ. Health Perspect.*, 64, 111-126.
46. Burnnemann, K.D. and Hoffmann, D. (1982) Pyrolytic origins of major gas phase constituents of cigarette smoke. *Recent Adv. Tox. Sci.*, 8, 103-140.
47. Kobzik, L., Bredt, D.S., Lowenstein, C.J., Gaston, B., Sugarbaker, D. and Stamler, J.S. (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 9, 371-399.
48. Asaon, K., Chee, C.B., Gaston, B., Lilly, C.M., Greard, C., Drazen, J.M. and Stamler, J.S. (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 10089-10093.
49. Guo, F.H., De Raeve, H.R., Rice, T.W., Stuehr, D.J., Thunnissen, F.B. and Erzurum, S.C. (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 7809-7813.
50. Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y. and Hayashi, Y. (1987) Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. *Carcinogenesis*, 8, 1959-1961.
51. Floyd, R.A., Weat, M.S., Enff, K.L., Hogestt, W.E. and Tingey, D.T. (1988) Hydroxy free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Rch. Biochem. Biophys.*, 262, 266-272.
52. Fiala, E.S., Conaway, C.C. and Mathis, J.E. (1989) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.*, 49, 5518-5522.
53. Loft, S., Fischer-Nielsen, A., Jeding, I.B., Vistisen, K. and Poulsen, H.E. (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA

- damage. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 40, 391-404.
54. Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J. and Ames, B.N. (1989) Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 9697-9701.
 55. Yermilov, V. Rubio, J. and Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid formation DNA by depurination. *FEBS Lett.*, 376, 207-210.
 56. Lander, H.M., Ogiste, J.S., Pearce, S.F.A., Levi, R. and Novogrodsky, A. (1995) Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21^{Ras}. *J. Biol. Chem.*, 270, 7017-7020.
 57. Lander, H.M., Jacovina, A.T., Davis, R.J. and Taura, J.M. (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by NO-related species. *J. Biol. Chem.*, 271, 19705-19709.
 58. Tsang, C.P., Kim, Y.J., Kumar, R. and Verma, A.K. (1994) Involvement of PKC in the transcriptional regulation of TPA-induced genes modulated by AP-1 or non AP-1 transacting factors. *Carcinogenesis*, 15, 707-11.
 59. Pardee, A.B. (1989) G. events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246, 603-608.

附錄一：

八十九年度空污費科研計畫(期中報告)審查意見回覆表

綜合評審意見：

1. 研究計畫乃探討 air pollutant NOx，對於 MRC-5 之 carcinogenesis 之 mechanism，現已發現 NOx 之 exposure 可以有 dose-response relation 之方式；產生 Peak II 可為 NOx 之 DNA damage indicator。而以 peak 為 7-NO-8-OH-Guanine，而其 mechanism 為直接攻擊與經過 iNOS 生成兩個途徑。其他 cell 變化之指標，包括 Rb-phosphorylation, p53, p21, cyclins, CDKs 均在研究中。

答：所有探討項目均已完成，但 7-NO-8-OH-Guanine 經再分析確認應為 8-NO₂-Guanine，但仍為相當好之 NOx 污染指標。

2. 肺癌之腫瘤形成都由纖毛上皮細胞形成，似乎不可能由肺纖維細胞形成，因此建議主持人以人類支氣管上皮細胞 BEAS-2B 進行可能較 MRC-5 適合。

答：以 BEAS-2B 進行是可行的，但我們考慮能用正常細胞最好，因為 BEAS-2B 為 transformed cell，再研究 NOx 致癌作用機轉上有其偏差。

3. Fig.12 在 48hr 之 NF-κB 之表現量明顯高於 Fig.13 之 50 μM NOx 之 NF-κB 表現量，請主持人詳加探討。

答：原圖十三已再重複試驗，已改為圖十二，並與 iNOS 合併。

4. Fig.20.顯示抽煙會誘發 7-NO-8-OH-G 的含量，雖然肺癌患者之 DNA adduct 較高，並非顯示 7-NO-8-OH-G 為肺癌之主因，可能是肺癌患者抽煙量較高或 DNA 修補能力較差。

答：肺癌之 8-NO₂-G 較高，文內並未強調為肺癌主因，只說與致肺癌有關，至於肺癌患者 DNA 修補能力較差，是有可能的。

附錄二：

期末報告初審回覆意見

一、文獻收集尚稱完整、對於所引用之文獻敘述尚稱合理。

二、研究方法分析到 8-NO₂-G，為相當敏感之外生性 NO_x 之污染指標，應屬合理。

三、本計劃以肺細胞探討 NO_x 之基因毒性，發現會形成 8-NO₂-G adduct 且有 dose-dependent relationship。同時亦再吸煙者淋巴球上之 DNA adduct 和其吸煙量成正相關。但卻不能證實為肺癌之形成主因（見 p.16 最後一行）。

答：本計劃目的為找出 NO_x 污染之指標 8-NO₂-G，研究證實無論在細胞、動物試驗及抽煙者均可使用 8-NO₂-G 為 NO_x 污染之生物指標。而肺癌之成因為多重因素，8-NO₂-G 之形成之“可能”為肺癌致病原因之一，欲證實其與肺癌之角色，有待進一步探討。

四、本計劃之「結果與討論」沒有任何討論，也沒有任何參考文獻引用。無法評估其發現成果之重要性。因此建議應修正本章內容。

答：已加入討論。

五、有 table and figures 應同時附有其圖表說明，以利閱讀。

答：已加入說明。

六、報告書請以雙面印刷。

答：已雙面印刷。

附錄三：

八十九年度環保科技合作計畫(空污費)期末自評表

項 目				
1. 計畫書內預期進度之達成度	超前	符合	落後	
◆ 目標訂定	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
◆ 目標管理	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
◆ 重要成果	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2. 相關研究文獻蒐集與敘述之完整性及合理	優	佳	可	劣
◆ 國內文獻回顧	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 國外文獻回顧	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 文獻內容與主題之關聯性	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 文獻是否整合敘述	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. 研究方法與過程的合理性與正確性	優	佳	可	劣
◆ 研究計畫架構與執行流程	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 研究方法依據之正確性	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 方法與預期成果之關聯性	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. 初期研究結果之合理性及正確性	優	佳	可	劣
◆ 數據分析與圖表彙整	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 理論探討與成果解說	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 學術或實務成果	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. 報告書撰寫之嚴謹性及完整性	優	佳	可	劣
◆ 報告撰寫架構與格式編輯之嚴謹性	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 報告撰寫內容與文字說明之通順與完整	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. 結論與建議之實用性	優	佳	可	劣
◆ 符合環保署空污防治之需求	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
◆ 研究成果可行性或建議性	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Ledgends to Figures

Fig. 1. Peroxynitrite synthesized. Solutions of 0.6 M NaNO₂ and 0.6 M H₂O₂ in 0.7 M HCl were pumped at 26 ml/min into a T-junction and mixed in a 3 mm diameter×2.5 cm glass tube. The peroxynitrous acid which formed was quenched by pumping 1.2 M NaOH at the same rate into a second T-junction. Excess H₂O₂ was destroyed by granuiar MnO₂.

Fig. 2. UV/vis spectra of peroxynitrite

Fig. 3. UV/vis spectra of the products formed by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro.

Fig. 4. Electrospray mass spectrum analysis (B) of peak II (A) (8-NO₂-G).

Fig. 5. Dose response of gaseous NO treatment on 8-NO₂-G formation in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution in indicated concentrations for 48hr. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm (A). 8-NO₂-G was quantatied (B) and expressed as µg per µg of DNA. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

Fig. 6. Time course of gaseous NO treatment on 8-NO₂-G formation in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution (50µM) for indicated time. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm. 8-NO₂-G was quantatied (B) and expressed asµg per µg of DNA. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

Fig. 7. The inhibitory effect of NAME on the formation of 8-NO₂-G in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution in 50□M and NAME (100µM) for 48hr. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

Fig. 8. Effects of gaseous NO treatment on iNOS protein expression in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution (50µM) for indicated time (A) and indicated concentrations for 48 hr (B). Three independent experiment were conducted, a representative one is show here.

Fig. 9. Dose response of gaseous NO treatment on the formation of 8-NO₂-G in

cell free DNA. DNA was isolated from MRC-5 cells and were treated with NO solution in indicated concentrations for 48hr. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm (A). 8-NO₂-G was quantatied (B) and expressed as µg per µg of DNA. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

Fig. 10. Analysis of formation of nitrite in NO medium incubated with or without MRC-5 cells for 48 hrs. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation.

Fig. 11. Formation of 8-NO₂-G in the DNA of cigarette smokers using high-performance liquid chromatography with electrochemical. Non-smokers control, n=12; Light-smokers (1 pack/day), n=15; Middle-smokers (1-2 pack/day for over 5-10 years), n=20; Heavy-smokers (over 2 pack/day for 10 years), n=13; Lung cancer with heavy smokers, n=14. Values were means; *p<0.05; **p,0.001 compared with non-smokers control.

Fig. 12. Effect of gas NO_x on NF-κB (A) and iNOS (B) protein levels of MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 µM Nox for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against NF-κB, iNOS and β-actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 13. Effect of gas NO_x on Raf and ERK protein levels of MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 µM NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against Raf, ERK and β-actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 14. Effect of gas NO_x on MEKK-1 (A), JNK1 (B) and p38 (C). MRC-5 cells treated with 50 µM NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against MEKK-1, JNK1, p38 and β-actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 15. Effect of gas NO_x on phosphorylation of JNK1 (A) and MKK4 (B) in the presence and absence of iNOS inhibitor (NAME) in MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against JNK1, MKK4 and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 16. Effect of gas NO_x on c-Fos (A) and c-Jun (B) protein levels of MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against c-Fos, c-Jun and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 17. Effect of gas NO_x on p53 protein levels (A) and phosphorylation of p53 (B) in MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against p53, phospho-p53 and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

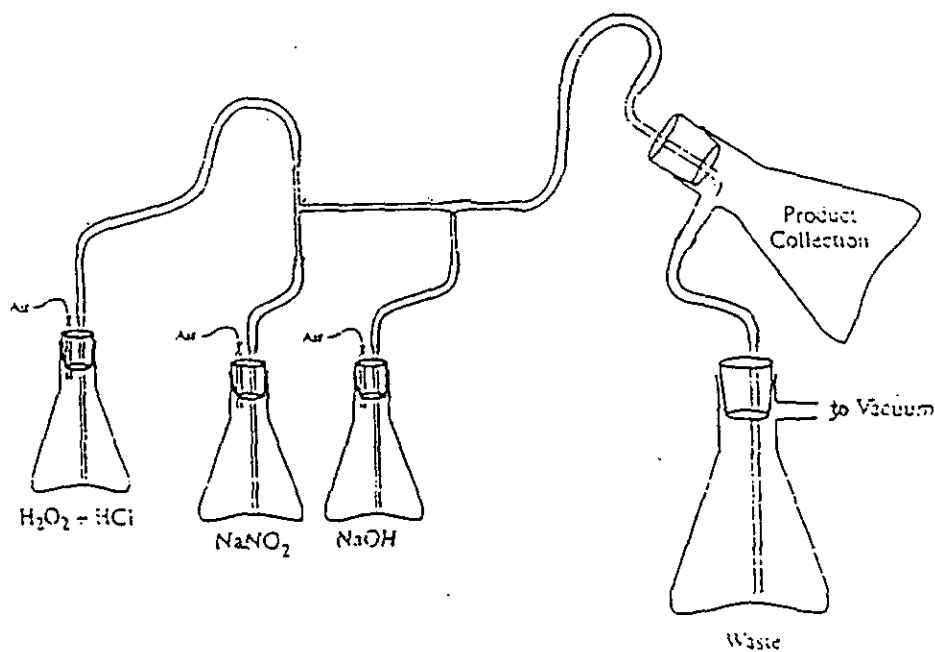


Fig. 1. Peroxynitrite synthesized. Solutions of 0.6 M NaNO_2 and 0.6 M H_2O_2 in 0.7 M HCl were pumped at 26 ml/min into a T-junction and mixed in a 3 mm diameter \times 2.5 cm glass tube. The peroxynitrous acid which formed was quenched by pumping 1.2 M NaOH at the same rate into a second T-junction. Excess H_2O_2 was destroyed by granular MnO_2 .

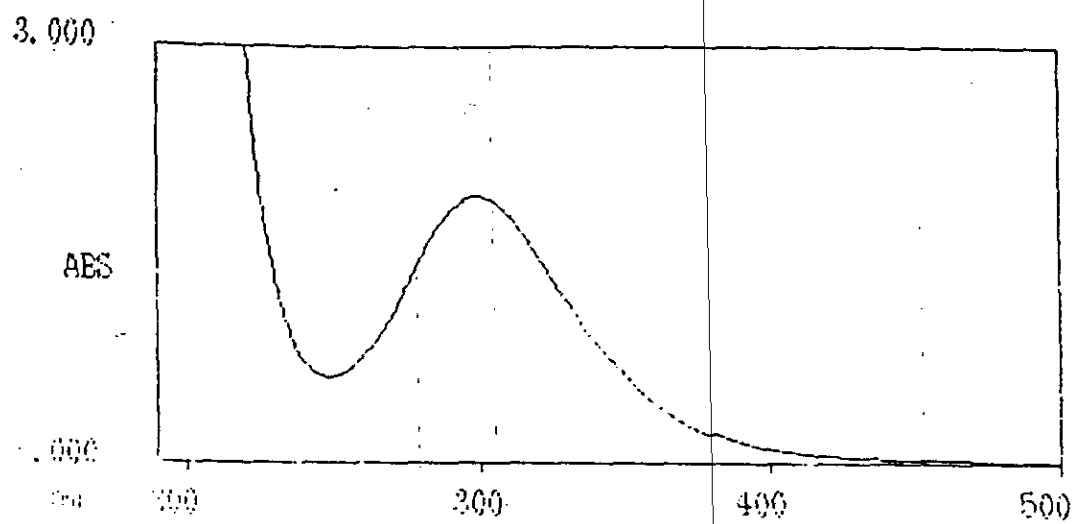


Fig. 2. UV/visible spectra of peroxyxynitrite.

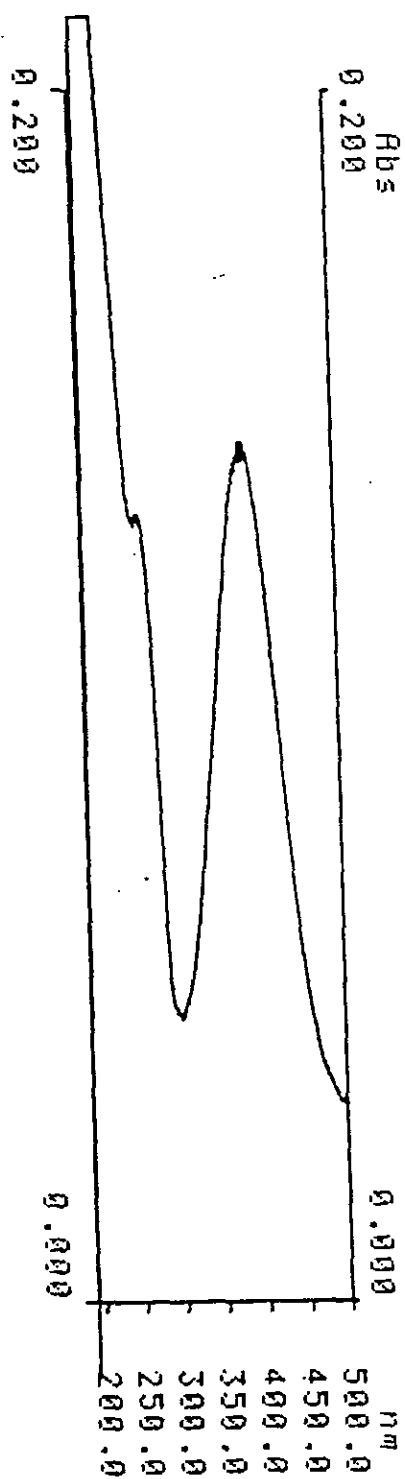


Fig. 3. UV/visible spectra of the products formed by the reaction of quanine with peroxyxynitrite in vitro.

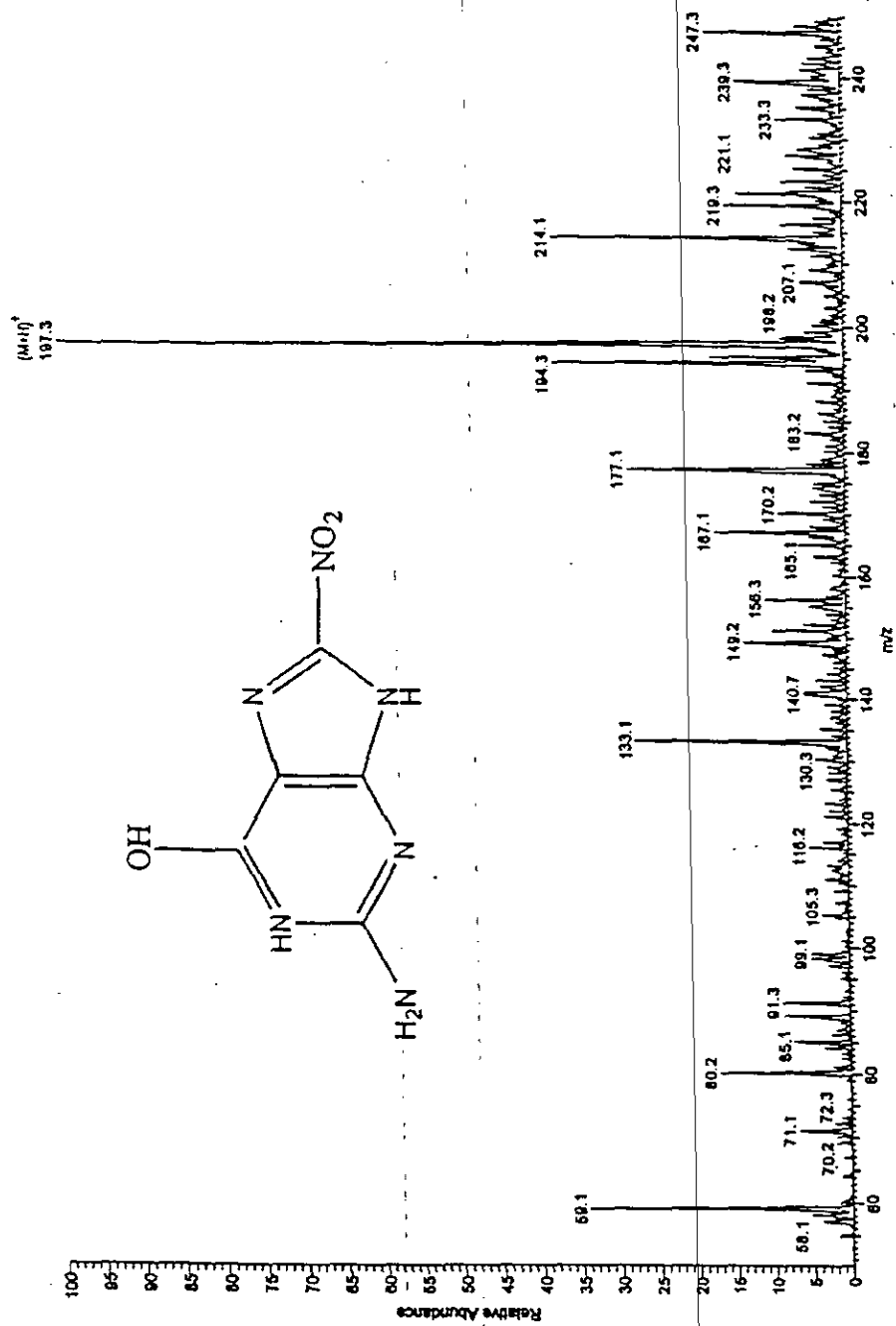


Fig. 4. Electrospray mass spectrum analysis (B) of peak II (A) (8-NO₂-G).

Fig. 4(A)

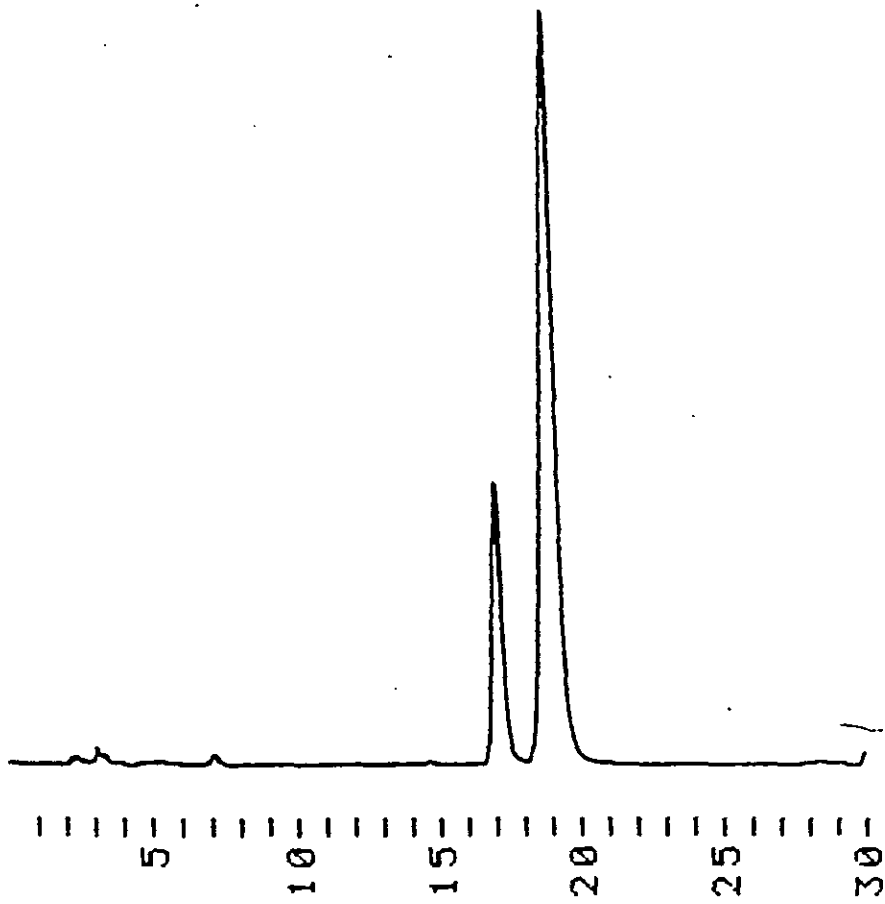


Fig. 4(B)

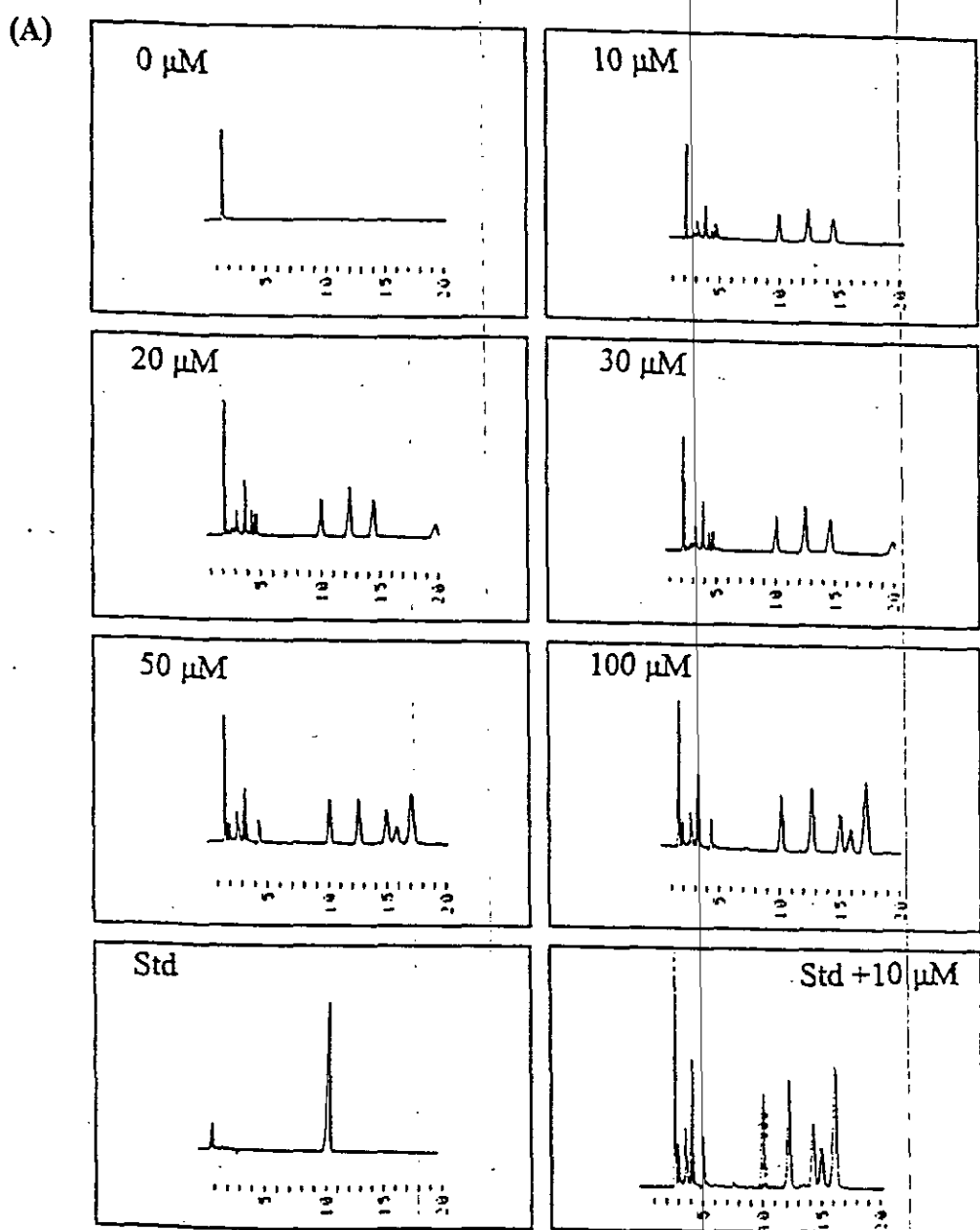


Fig. 5. Dose response of gaseous NO treatment on 8-NO₂-G formation in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution in indicated concentrations for 48hr. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm (A). 8-NO₂-G was quantitated (B) and expressed as μg per μg of DNA. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

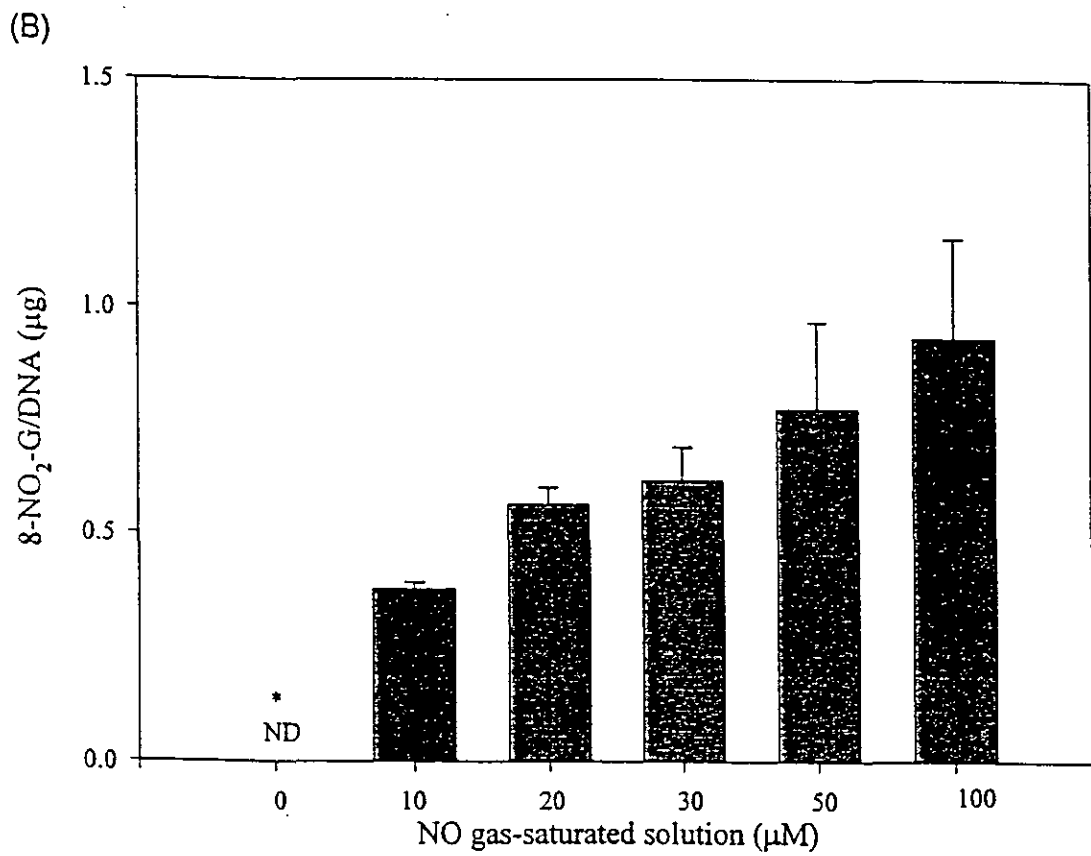


Fig. 5B

(A)

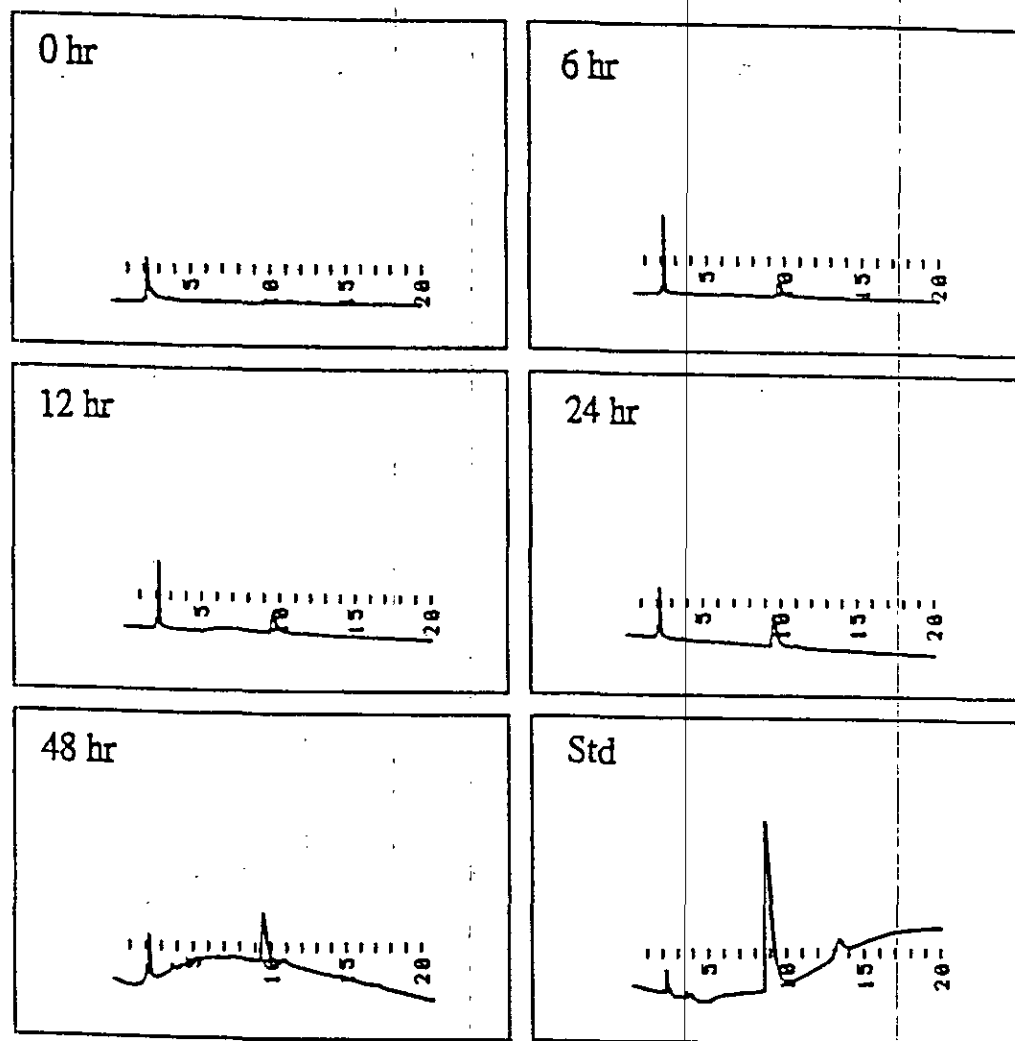


Fig. 6. Time course of gaseous NO treatment on 8-NO₂-G formation in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution (50 μM) for indicated time. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm. 8-NO₂-G was quantitated (B) and expressed as μg per μg of DNA. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

(B)

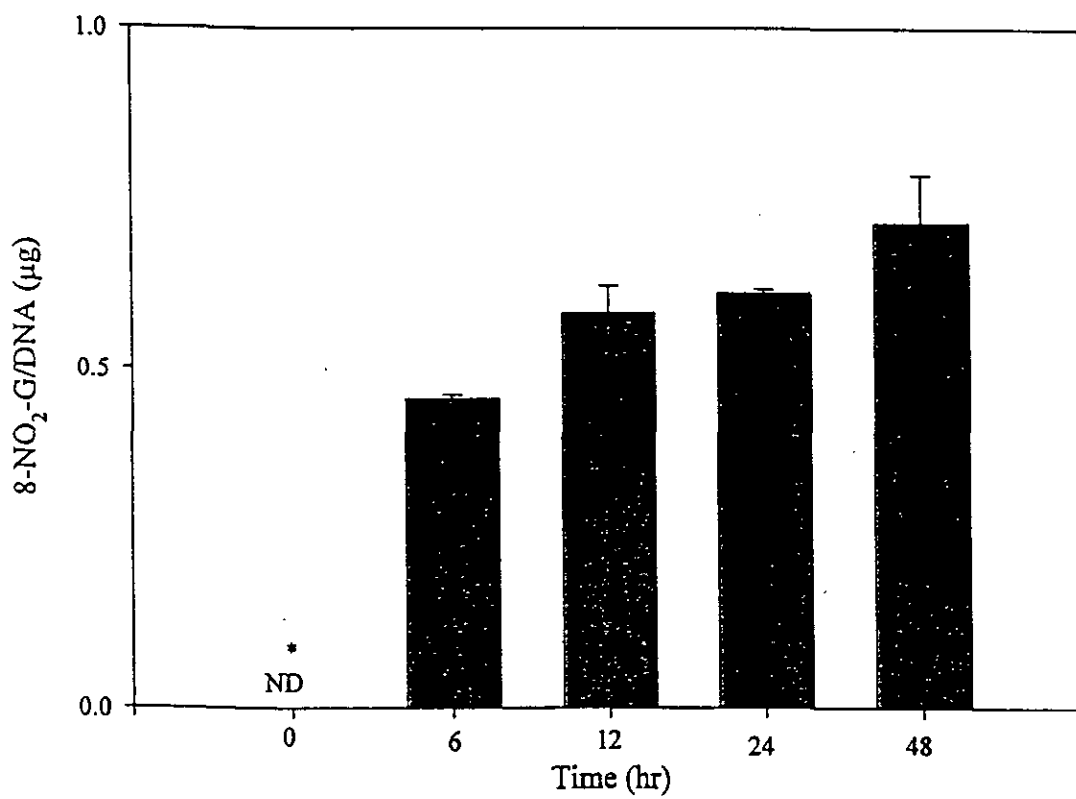


Figure 6B

are the three

8-NO₂-G standards, 100 µg

Fig. 6B

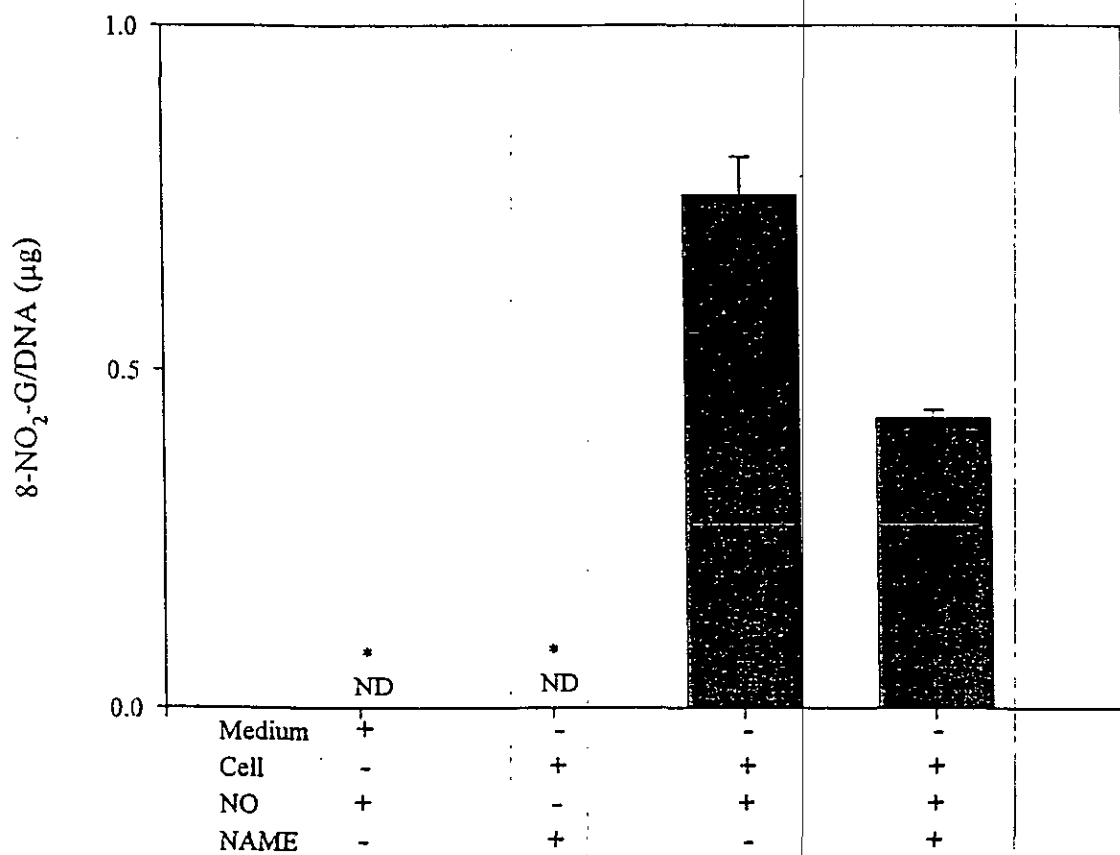


Fig. 7. The inhibitory effect of NAME on the formation of 8-NO₂-G in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution in 50µM and NAME (100µM) for 48hr. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm. The values are the three experiments; the error bars are indicated the standard deviation. Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

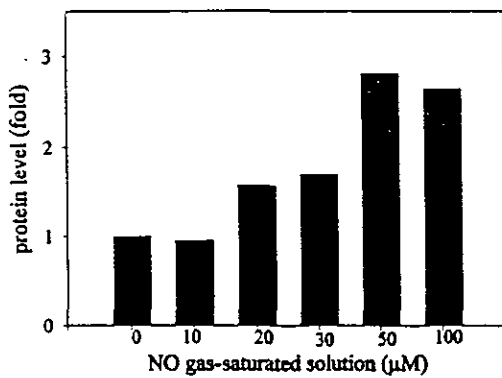
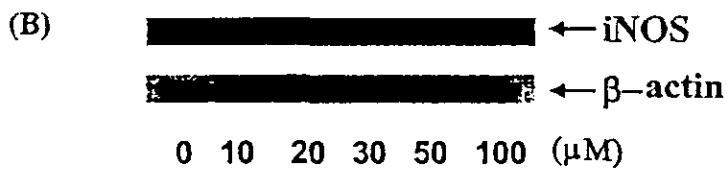
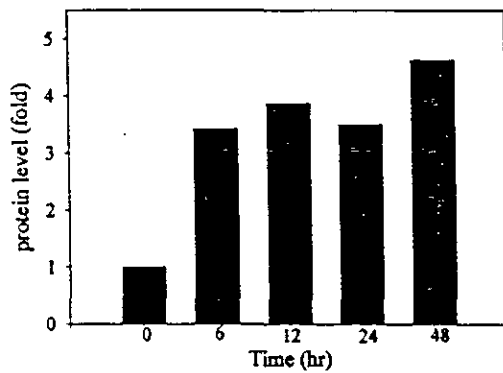
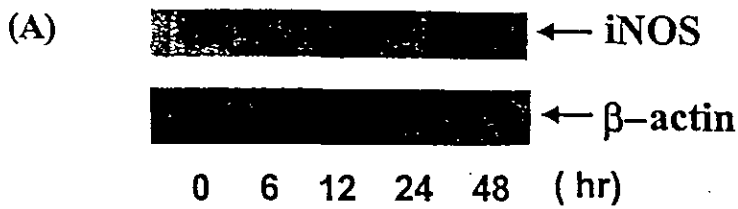


Fig. 8. Effects of gaseous NO treatment on iNOS protein expression in MRC-5 cells. Culture cells were treated with NO solution (50 μ M) for indicated time (A) and indicated concentrations for 48 hr (B). Three independent experiment were conducted, a representative one is show here

(A)

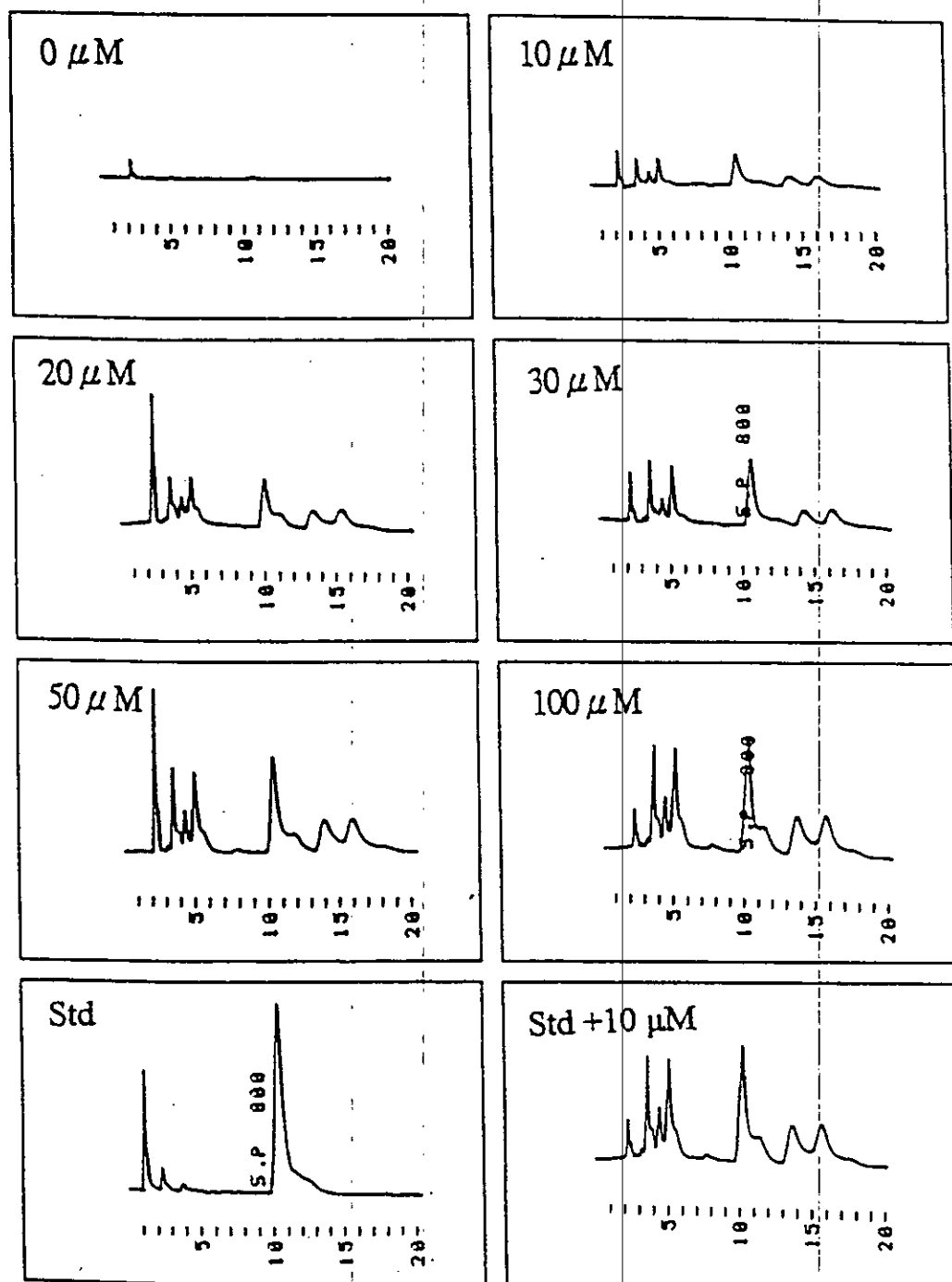


Fig. 9. Dose response of gaseous NO treatment on the formation of 8-NO₂-G in cell free DNA.

DNA was isolated from MRC-5 cells and were treated with NO₂ solution in indicated concentrations for 48hr. Formation of 8-NO₂-G was analyzed by HPLC and monitored at 395 nm (A). 8-NO₂-G was quantatied (B) and expressed as μg per μg of DNA. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation.

Std: 8-NO₂-G standards; *ND: not determined.

(B)

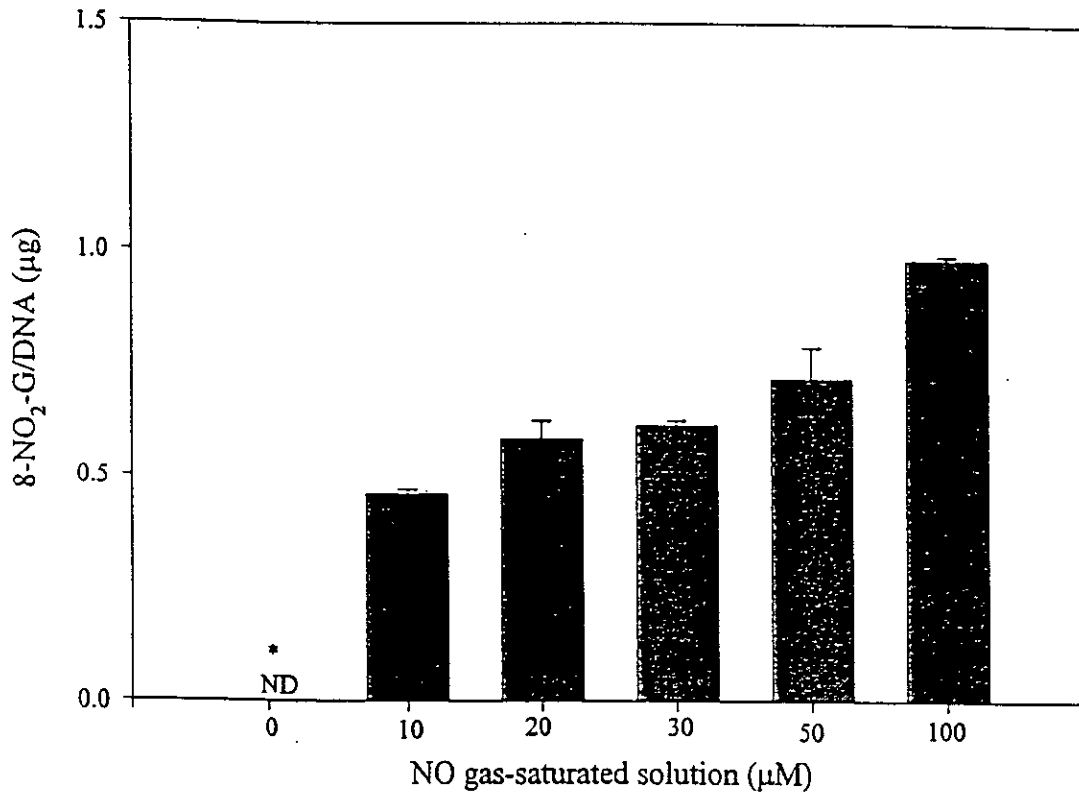


Fig. 9B

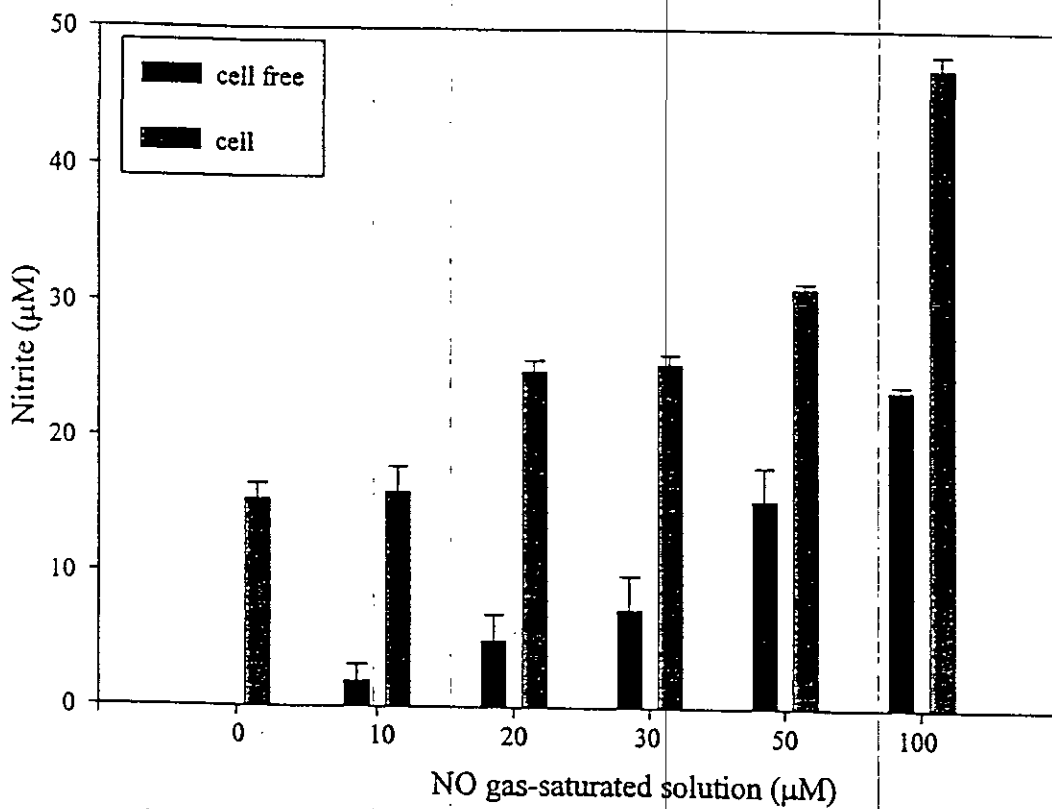


Fig. 10. Analysis of formation of nitrite in NO medium incubated with or without MRC-5 cells for 48 hrs. The values are the three experiments, the error bars are indicated the standard deviation.

Fig. 10

Fig. 11

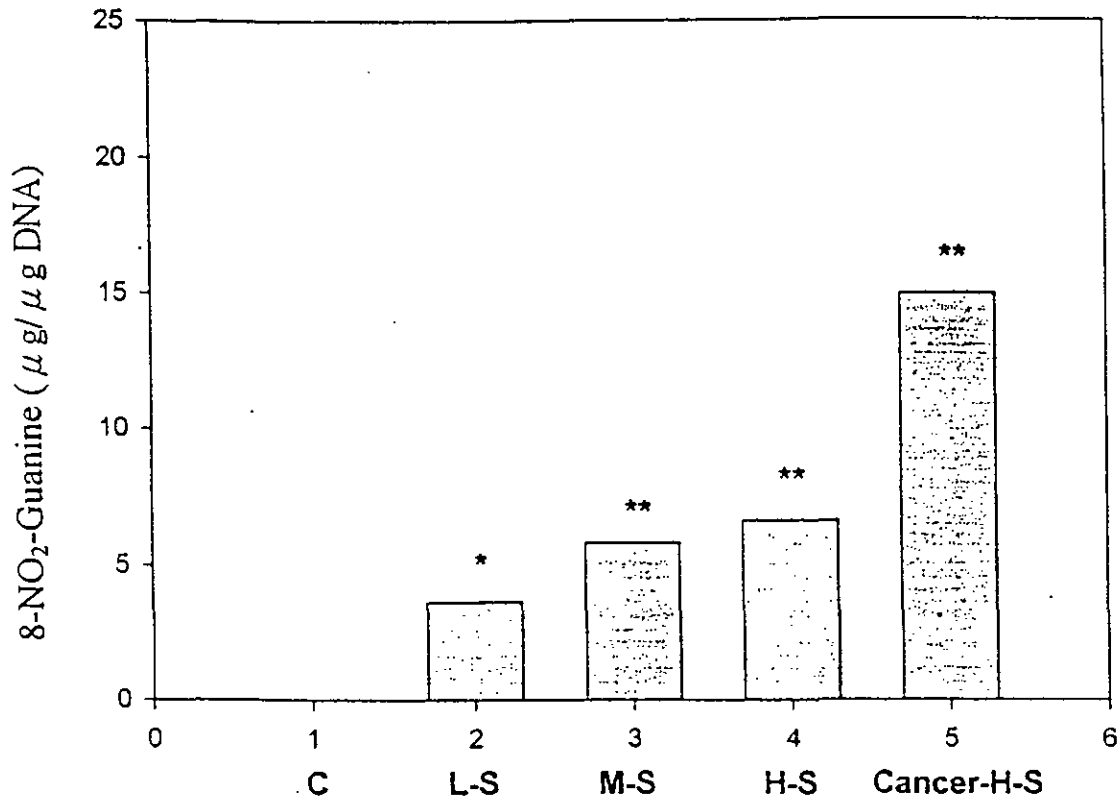


Fig. 11. Formation of 8-NO₂-G in the DNA of cigarette smokers using high-performance liquid chromatography with electrochemical. Non-smokers control, n=12; Light-smokers (1 pack/day), n=15; Middle-smokers (1-2 pack/day for over 5-10 years), n=20; Heavy-smokers (over 2 pack/day for 10 years), n=13; Lung cancer with heavy smokers, n=14. Values were means; *p<0.05; **p,0.001 compared with non-smokers control.

Fig. 12-(A)

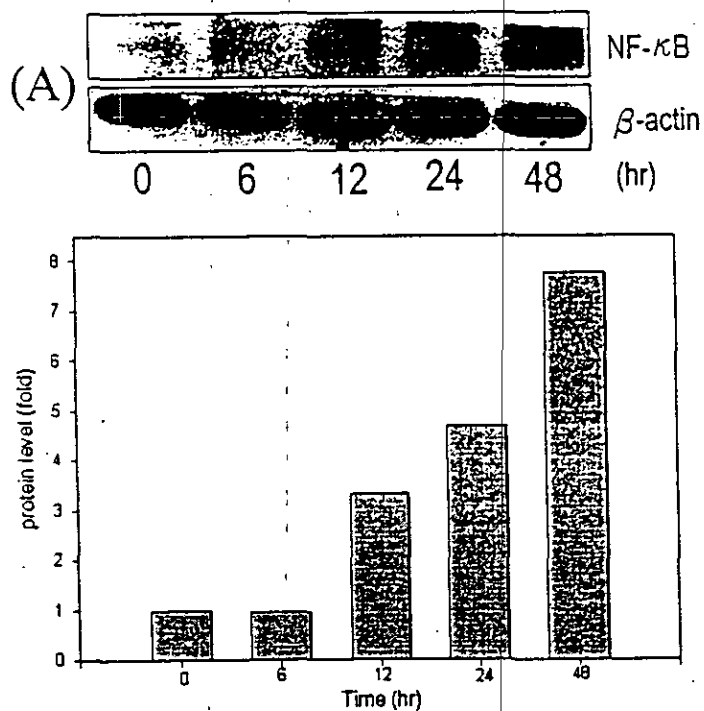


Fig. 12. Effect of gas NO_x on NF-κB (A) and iNOS (B) protein levels of MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μM Nox for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against NF-κB, iNOS and β-actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 12-(B)

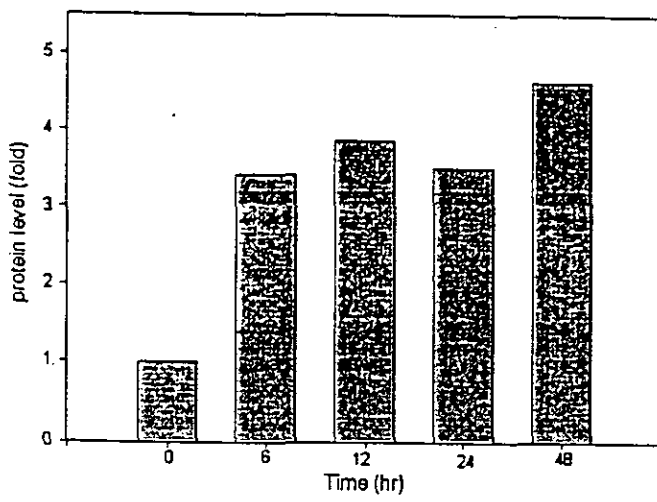
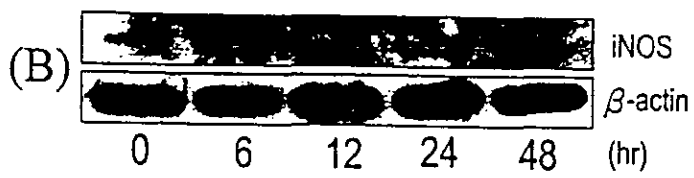


Fig. 13

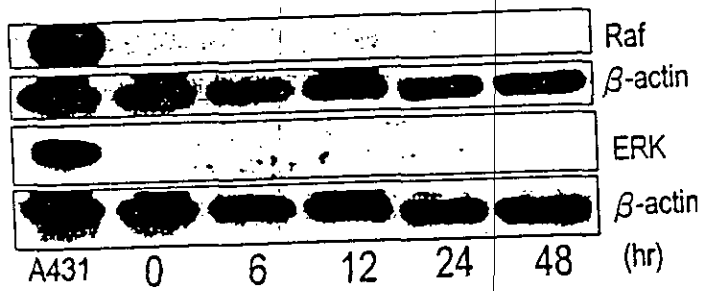


Fig. 13. Effect of gas NO_x on Raf and ERK protein levels of MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against Raf, ERK and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 14-(A)

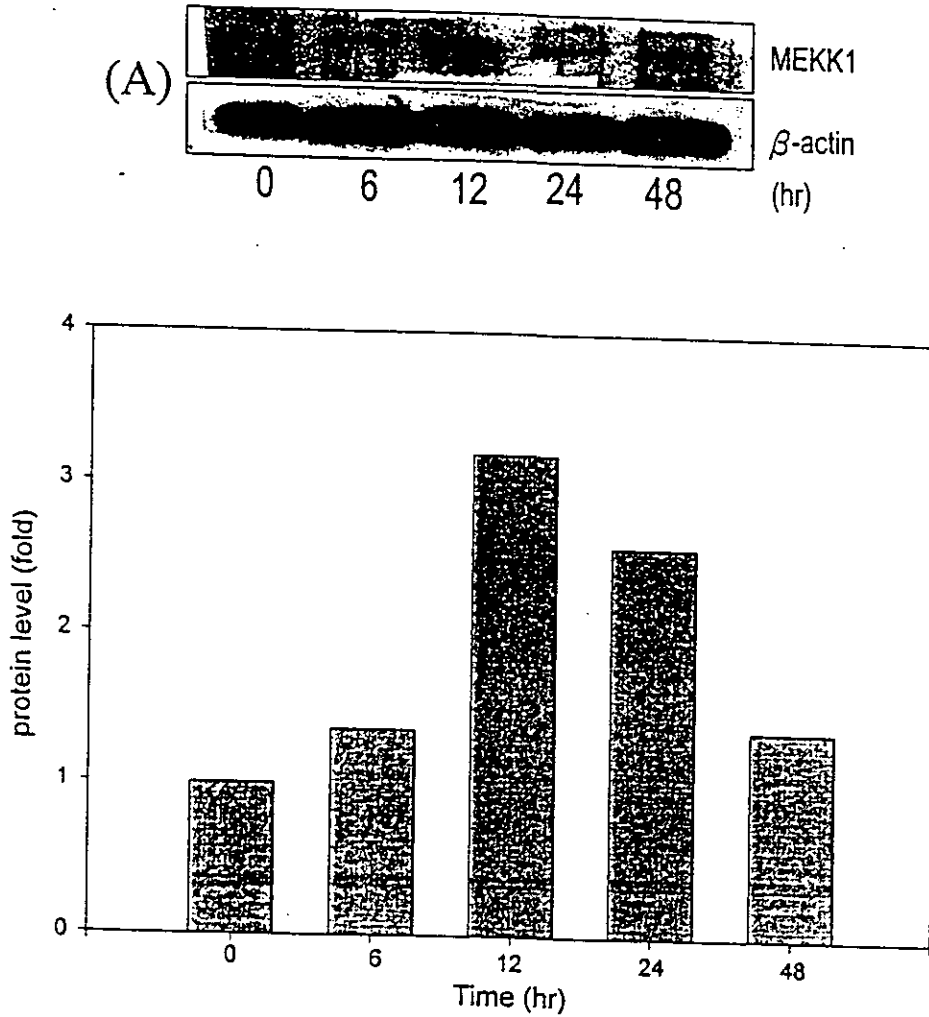


Fig. 14. Effect of gas NO_x on MEKK-1 (A), JNK1 (B) and p38 (C). MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against MEKK-1, JNK1, p38 and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 14-(B)

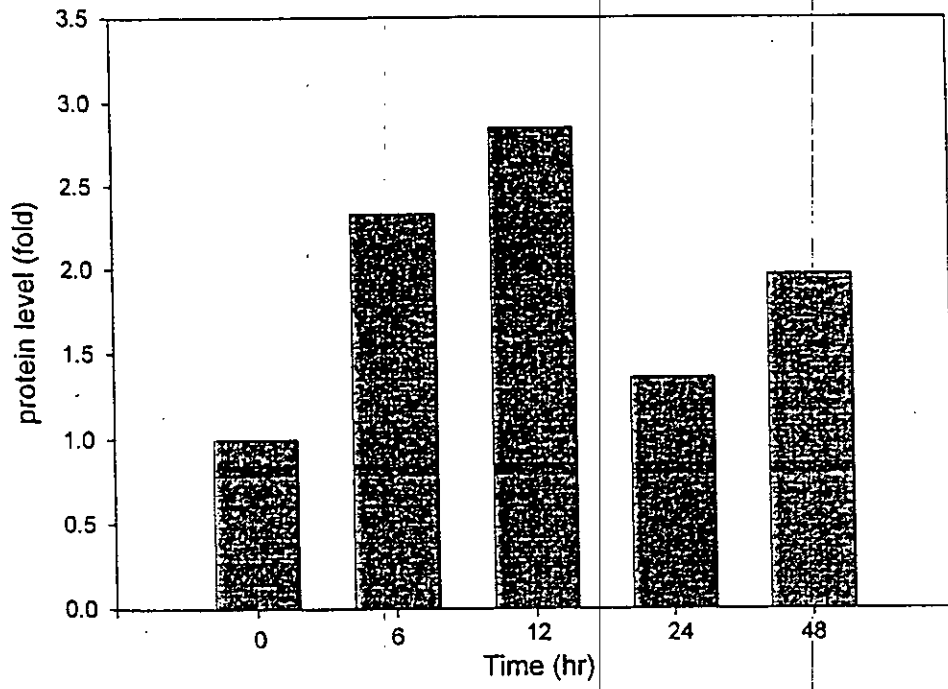
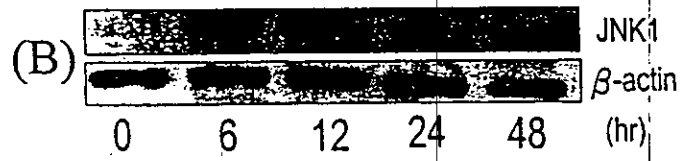


Fig. 14-(C)

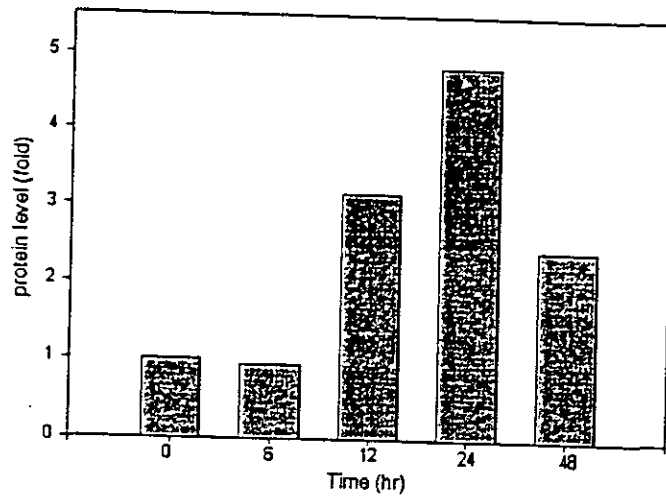
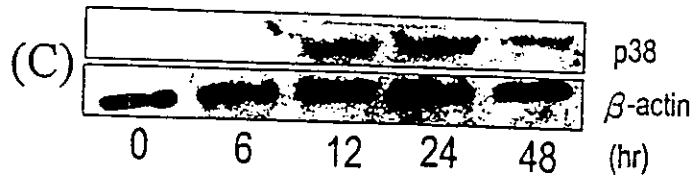


Fig. 15-(A)

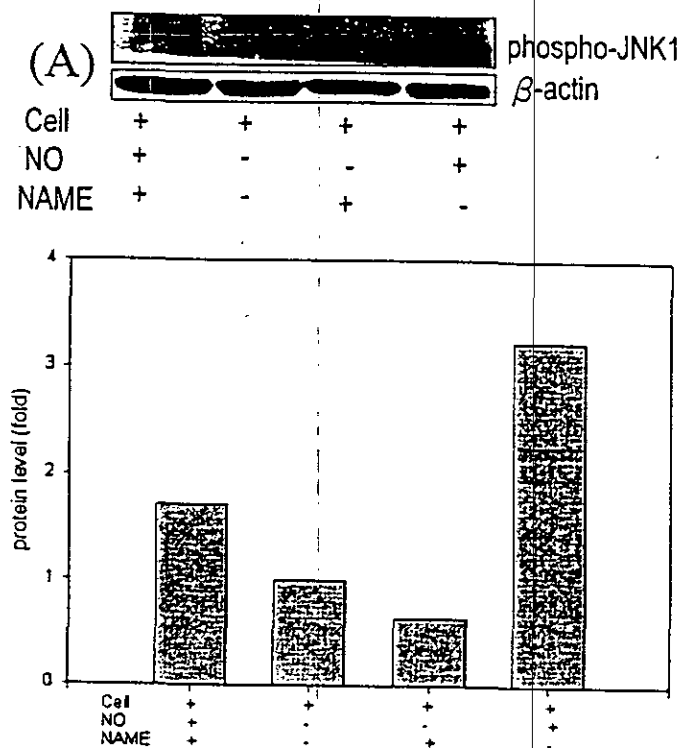


Fig. 15. Effect of gas NO_x on phosphorylation of JNK1 (A) and MKK4 (B) in the presence and absence of iNOS inhibitor (NAME) in MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against JNK1, MKK4 and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 15-(B)

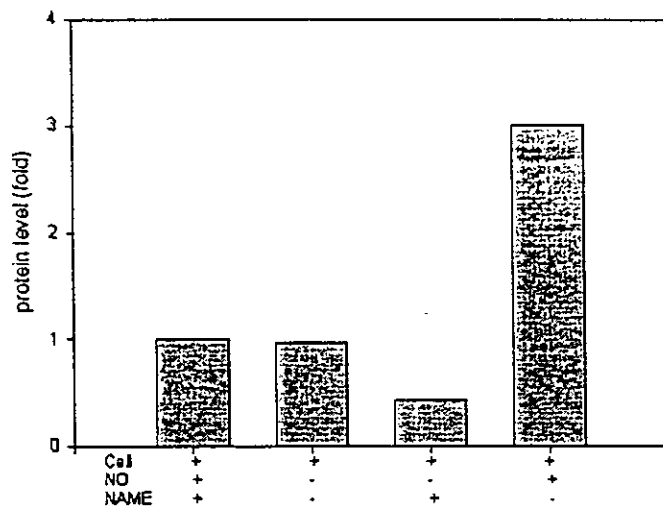
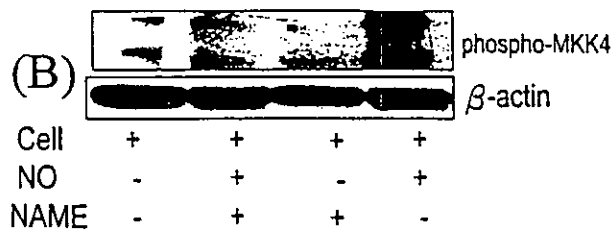


Fig. 16-(A)

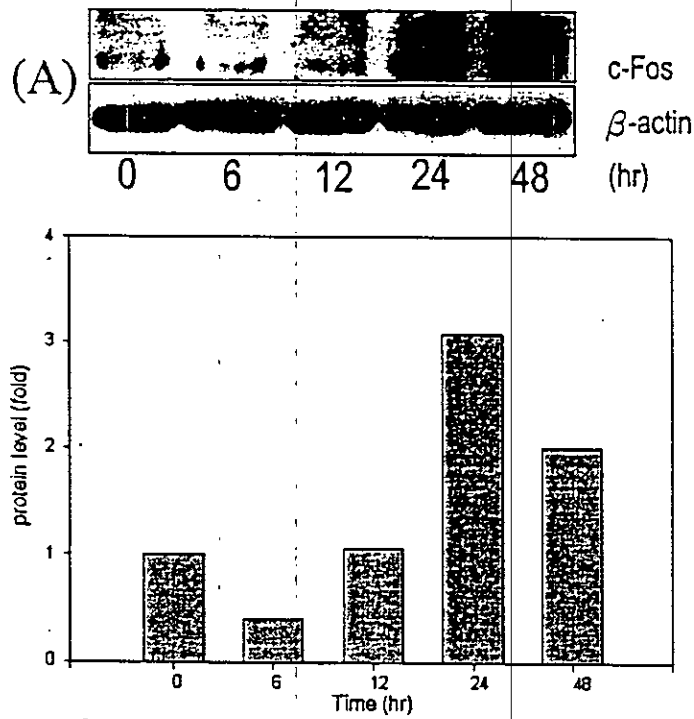


Fig. 16. Effect of gas NO_x on c-Fos (A) and c-Jun (B) protein levels of MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against c-Fos, c-Jun and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 16-(B)

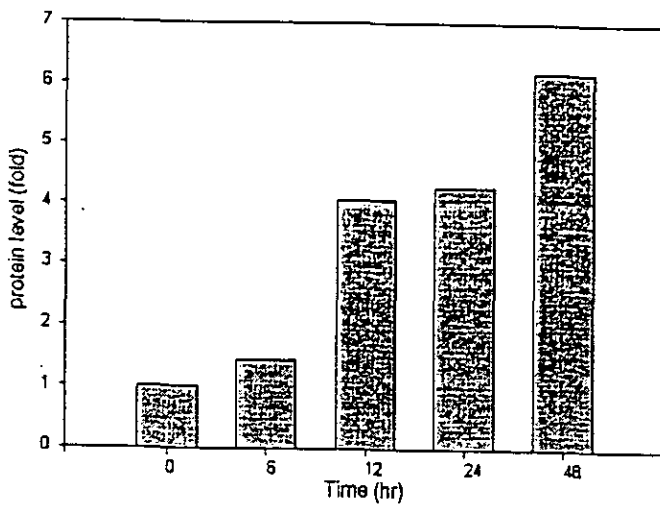
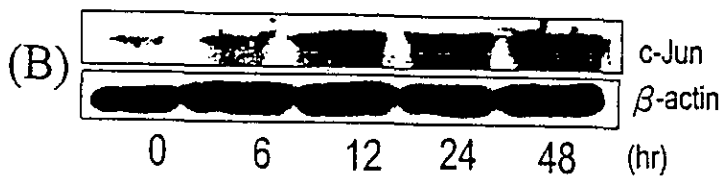


Fig. 17-(A)

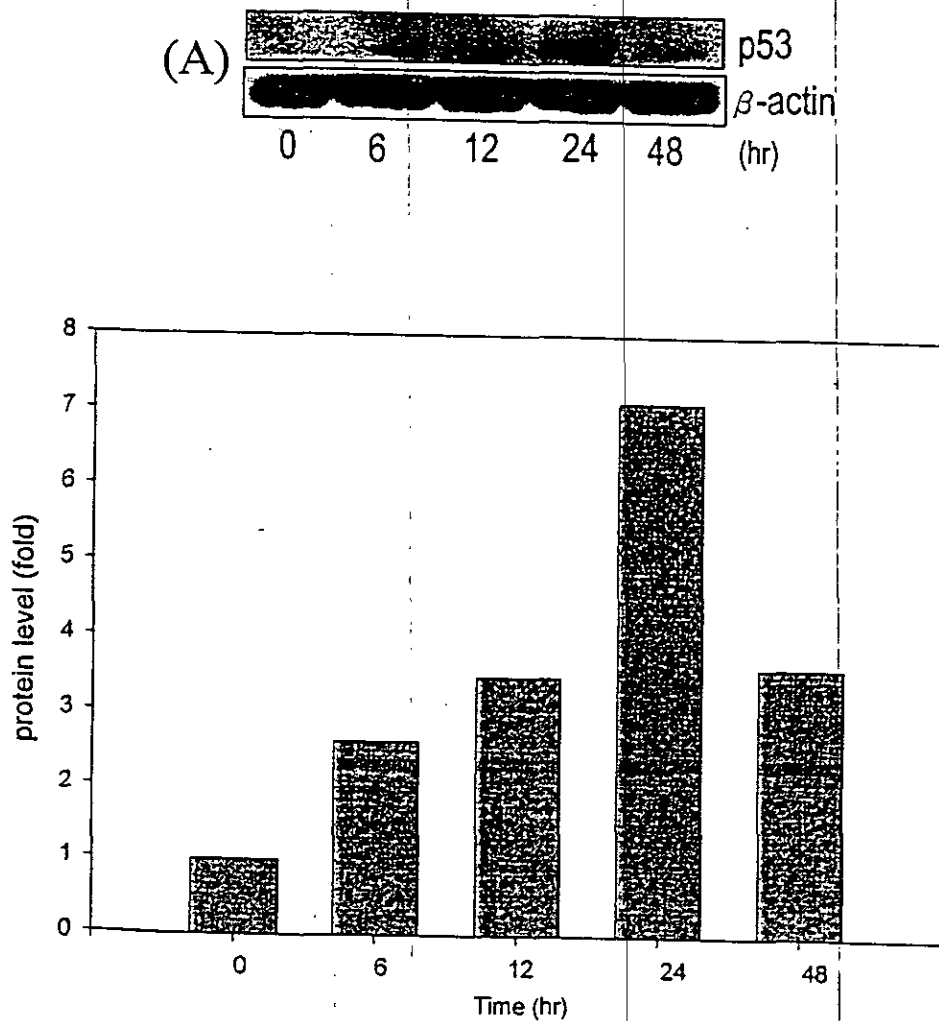


Fig. 17. Effect of gas NO_x on p53 protein levels (A) and phosphorylation of p53 (B) in MRC-5 cells. MRC-5 cells treated with 50 μ M NO_x for the indicated times were analyzed by 10% SDS-PAGE and subsequently immunoblotted with antisera against p53, phospho-p53 and β -actin, which served as an internal control. Densitometric quantitation of the autoradiogram in arbitrary units. The result shown is one data set representation of two independent experiments.

Fig. 17-(B)

