



計畫編號：DOH94-TD-G-111-030

行政院衛生署九十四年度科技研究計畫

環境因子（烹飪油煙）致女性肺腺癌之基因體毒理
與蛋白質體學研究

研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：林嬪嬪、張惠華 教授

研究人員：張雲菁、何佳琪

執行期間：94年5月1日至94年12月31日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，依合約之規定：如對
媒體發布研究成果應事先徵求本署同意*

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、中文摘要	(3)
二、英文摘要	(4)
三、前言	(6)
四、材料與方法	(13)
五、結果	(21)
六、討論	(25)
七、結論與建議	(27)
八、94 年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議	(28)
九、參考文獻	(29)
十、圖	(32)
十一、表	(36)

共 (37) 頁

中文摘要

女性肺腺癌 (FLAC) 在台灣不僅是發生率高而且也佔婦女癌症死亡率之首位。流行病學證據顯示，在所有環境風險因子中，以烹飪油煙 (COF) 關係最為密切，而烹飪油煙中被認為造成癌症之主要成份為致突變劑 *tt*-DDE 及致癌物 BaP。先前本實驗室研究證實，在人類支氣管上皮細胞株 (BEAS-2B) 長期處理 *tt*-DDE (45 天) 會促進細胞增生，且因產生氧化僅迫使細胞激素表現量增加。近來，進一步發現長期處理 *tt*-DDE 會導致 *p27* mRNA 及蛋白量降低，另外，再利用二種抗氧化劑 (Vitamin C 或 NAC) 分別與 *tt*-DDE 共同處理下，抑制 *tt*-DDE 之作用，使 *p27* mRNA 及蛋白表達量回復趨於正常值。結果證實 *tt*-DDE 是經由氧化緊迫導致 *p27* 表現降低進而導致細胞增生。參考國家衛生研究院建立之女性肺腺癌基因體資料庫，發現在 17 位患者中有 14 位其 *p27* 之表達量亦降低，此結果與本實驗互相印證。慢性發炎被認為是癌化作用之早期指標，因此，我們擬探討 BaP 和 E2 調控發炎相關之基因表現。我們觀察到 BEAS-2B 細胞處理單獨 BaP 會導致數種細胞激素表現量增加，且在共同處理 BaP 和 E2 下，數種細胞激素表現量愈高，另外，亦導致 COX-2 mRNA 的表現量和 PGE2 分泌量比單獨處理 BaP 的表現量高。由此證實，BaP 和 E2 對促進發炎反應具有協同作用，但是其機制需要更深入的探討。綜合本計畫目前研究成果，我們證實烹飪油煙中兩種主要致癌或致突變物，*tt*-DDE 及 BaP，於人類肺細胞中會改變某些與癌症發生初期相關之基因表現，而且雌性素會加強 BaP 改變這些基因表現之作用。由這些證據推測女性暴露烹飪油煙可能對肺細胞造成較大的影響，有利於肺細胞初期癌化的發生，而同時處理抗氧化劑可減緩 *tt*-DDE 的作用，因而建議攝取抗氧化劑可減少烹飪油煙對肺細胞之影響。我們將進一步探討如何阻斷 BaP 與雌性素之交互作用，以減少女性暴露烹飪油煙所造成之傷害。

英文摘要

Female lung adenocarcinoma (FLAC) is not only unusually abundant; it is also the leading cause of cancer death among women in Taiwan. Among all potential environmental risk factors, cooking-oil fumes (COF) bear the most and strongest epidemiological evidence to be closely associated to the development of FLAC. The most concerning constituents in COF are perhaps BaP, a potent carcinogen, and tt-DDE (trans, trans-2,4-decadienal), a known mutagen. Previously we demonstrated that long-term treatment (45 days) with tt-DDE increased cell proliferation and cytokines secretion via oxidative stress in human bronchial epithelial cells BEAS-2B. Recently, we found that long-term treatment with tt-DDE significantly reduced p27 mRNA and protein levels, which was prevented by co-treatment with antioxidants, N-acetylcysteine and vitamin C. It appears that tt-DDE-induced oxidative stress contributed to p27 reduction, which may involve in the mechanism of tt-DDE-induced cell proliferation. Consistently, p27 mRNA levels were reduced in 14 out of 17 FLAC, comparing with paired non-tumor tissues (in the genomic database of FLAC generated by NHRI). We are examining effects of tt-DDE on expression of p27 related genes or proteins. Chronic inflammation is considered as the early event of carcinogenesis. Therefore, we investigated the interaction between BaP and 17-beta estradiol (E2) on expression of inflammation-related genes. BaP alone significantly induced several cytokines expression in BEAS-2B cells. Co-treatment with E2 potentiated BaP-induced cytokines expression in BEAS-2B cells. Furthermore, the combination of BaP and E2 significantly increased cyclooxygenase 2 mRNA levels as well as prostaglandin E2 secretion in BEAS-2B cells. These data suggest that

BaP and E2 synergistically enhance inflammatory response in the lung epithelial cells. The mechanism is under investigation.

前言

I. 烹飪油煙 (cooking oil fumes, COF)

傳統上，中國婦女習慣在煮菜前，先將烹飪油加熱至 250°C，此時烹飪用油經高溫加熱會產生煙霧，加上中國婦女長時間待在廚房中，以煎、炒、炸等方式烹飪食物，因此，可能與肺癌之形成有關。Wen Cheng 等人 (2003) 研究報告顯示，在台灣大部分肺癌的發生是與吸菸有關，而其中有 10% 的女性肺癌病人是因為經常暴露烹飪油煙 (cooking oil fumes, COF) 所導致，推測暴露烹飪油煙與肺癌有密切關係。已知廚房室內空氣污染源有兩種，一類與烹飪時所用的爐具燃料有關，例如煤炭、木材、天然氣等不完全燃燒後，產生多環芳香烴類致癌物 (Wu-Williams et al., 1990)。另一類為烹飪時所產生的油煙，烹飪時，肉類經油煎會產生梅納反應 (Maillard reaction production)，此為非酵素性褐變反應，並使得蛋白凝結。當表面的溫度升高時，濕度相對的降低，因化學及物理變化而使表面脂肪形成外皮 (crust)，隨著溫度從 100°C 持續增加，表皮會不斷的脫水，再加上化學反應，外皮會形成多孔的絕緣層般，使原本在外皮下的水蒸氣往內跑，但因蛋白質經加熱而破壞結構並皺縮時，水分及肉汁就會往外流出，於高熱下形成蒸氣而揮發為油煙，當食物內溫度持續上升，更加速水份的流失，油煙也會迅速的增加。

COF 是一種混合性的產物，包含上千種以上的化合物 (Li et al., 1994)。目前已知 COF 產生的污染物，大致可區分為粒狀污染物及氣狀污染物兩大類 (Chiang et al., 1999b)。粒狀污染物中主要具有基因毒性之毒物已知有多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、硝基多環芳香烴類化合物 (nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitro-PAHs) 等化合物 (Fu et al., 1997; Wu et al., 2004)。氣狀污染物則有甲醛、乙醛、丙烯醛等污染物。分別詳述如下：

(一)、粒狀污染物

(1)多環芳香烴類化合物 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)

多環芳香烴類化合物是一種廣泛分佈於環境中的污染物，通常是有機化合物不完全燃燒所致。多環芳香烴類化合物藉由不同方式進入生物活動範圍，如燃料燃燒後直接釋放於空氣中、工廠或污水排放至飲用水以及地面水的循環作用。這類化合物會經由揮發、吸收、氧化、光解及生物代謝等機制，從環境中自然分解而消失。香煙煙霧懸浮微粒、汽機車或飛機引擎所排放的燃油廢氣含有多種多環芳香烴類化合物，除此之外，Li (1994) 發現三種食用油，包括蔬菜油、大豆油及精製蔬菜油，經 265°C 以上加熱後所產生的煙霧中也含有許多的多環芳香烴類化合物。Shields 等人 (1995) 和 Zhu 等人 (2003) 證明食用油所含的多環芳香烴是致癌物，推測是造成廚師和中國婦女罹患肺癌的起始因子。多環芳香烴類化合物在生物體內首先經由微粒體單氧合酶 (monooxygenase) 或前列腺素 H 合成酶 (prostaglandin H synthase; cyclooxygenase) 代謝活化成環氧化物 (epoxide)，然後再水解轉變為二酚 (diols) 型的活化中間產物，與 DNA 共價鍵結形成 DNA 鍵結物，而造成基因突變進一步引起癌症 (Dipple et al., 1987)。Wen Cheng 等人 (2003) 亦證實 COF 會產生大量 DNA 鍵結物，使 p53 基因突變，可能因而引起肺組織癌化。

(2) 硝基多環芳香烴類化合物 (Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitro-PAHs)

硝基多環芳香烴類化合物是由多環芳香烴，經硝基取代反應後所生成的衍生物。它是另一類主要的空氣污染物，同樣廣泛分佈於環境中，如汽車排放廢氣、抽煙、都市空氣懸浮微粒、焚燒排放物、煙囪、煤灰、家庭用瓦斯加熱器和煤油加熱器，甚至烤雞及茶等食物中都發現有硝基多環芳香烴類化合物的存在 (Chen and Chen, 2003; Chen et al., 2003; Fu, 1990; Kinouchi et al., 1986; Tokiwa et al., 1985; Tokiwa

and Ohnishi, 1986), 其中以 1-nitropyrene (1-NP)、1,6-dinitropyrene (1,6-DNP)、1,8-DNP 及 1,3-DNP 為主。Wu 等人 (1998) 發現, 台灣地區常用的三種油 (豬油、大豆油及花生油) 含有 1,3-dinitropyrene 及 (1,3-DNP) 1-nitropyrene (1-NP) 兩種具致突變性化合物。

(二)、氣狀污染物

來自於油脂裂解或氧化作用之羰基 (carbonyl) 化合物在油脂食品中扮演不同角色, 特別是揮發性醛類 (aldehydes), 將使食品失去味道及營養 (Stephan and Steinhart, 1999)。許多研究顯示, 烹飪過程中, 將食用油高溫 (250°C) 加熱時會產生含有揮發性醛類化合物之煙霧 (Shields et al., 1995; Warner, 1999; Zhu et al., 2001)。Shields 等人 (1995) 分析經 240-280°C 加熱後所產生的油麻菜籽油煙霧, 發現其煙霧成分中含有大量的亞麻油酸 (linoleic acid)、1,3-丁二烯、苯 (benzene)、甲醛和乙醛等化合物, 推測這些化合物可能為肺癌發生之危險因子。Ramirez 等人 (2004) 將豬肉利用不同食用油烹調, 發現揮發性的煙霧成分中含有多種醛類化合物 ketones, alcohols、and hydrocarbons、benzaldehyde、nonanol、hexanal and a sulfur compound (dimethyl disulfide) 及其它醛類化合物等。

II. COF 之生物毒性與基因毒性

Wu 等人 (1998) 指出, 將豬油、沙拉油和花生油加熱到 $250 \pm 10^\circ\text{C}$ 時所產生的油煙會使 CHO-K1 細胞產生基因毒性。Berg 等人證實烹飪各類肉類食品所生成的煙霧, 具有不同程度的致突變性 (Berg et al., 1990)。Chiang 等人在 1998 年報告指出, 豬油加熱到 200°C 以及沙拉油加熱到 300°C 時生成的油煙, 對於加有 S9 代謝活化酵素之沙門氏桿菌 TA98 具有致突變 (Chiang et al., 1998)。Lofroth 等人在更早之前已發現, 油煙中致突變物含量與烹飪時間呈正相關性 (Lofroth et al.,

1991)。

Wu 等人 (2001) 以烹飪食用油 (花生油) 加熱至 200°C 用 3 μm 濾紙收集 45 分鐘後，在中性條件下的甲醇萃取物，以 GC Mass 進行其醛類化合物成分之分析，結果指出主要成分 1-Pentanol、2-Heptenal、n-Nonanal、*trans*-2-Octenal、n-Heptanol、n-Pentadecane、1-Octenal、*trans*-2-Decenal、n-Heptadecane、*trans,trans*-2,4-Nonadienal、*trans*-2-Undecenal 和 *trans-trans*-2,4-decadienal (*tt*-DDE)，其中 *tt*-DDE 具是強的致突變性化合物。Wu 等人 (2004) 指出，將 50-200 μM *tt*-DDE 處理人類肺癌細胞 (A-549)，結果指出 *tt*-DDE 能使癌細胞的氧化性緊迫上升和產生基因毒性。

已知 COF 中的致突變物以 PAHs 為主，且在細胞實驗中，發現主要的 DNA 鍵結物為 anti-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyrene (BPDE) (Yang et al., 2000)。人體內 BaP 主要是經由 CYP 1A1 酵素系統代謝活化成最終代謝物 BPDE，其會攻擊 DNA 的 dG 之 N2 位置，使其具有致突變性、致癌性和致腫瘤性 (Jeffrey et al., 1976)，因此，可將 CYP 1A1 基因表現作為油煙中粒狀污染物的指標。COF 中另外一個要注意的物質為揮發性物質，如醛類、苯等。最近學者漸漸重視脂質過氧化作用，加熱或油炸食品容易促使油脂氧化，油脂氧化所生成的過氧化物 (hydroperoxide) 在體內會導致 O₂⁻ 或 ·OH 等游離基的產生，對 DNA 造成傷害而生成氧化性鹼基，例如 8-hydroxy-dehyguanosine (8-OH-dG)，而其中油脂氧化所生的 MDA，對 DNA 會造成氧化性傷害 (Marnett, 1999)。

III. *tt*-DDE 之生物毒性、基因毒性與致癌性

已知 COF 中的致突變物以 PAHs 和 Nitro-PAHs 為主，其次為醛類 (aldehydes) (Chiang et al., 1997; Wu et al., 1998; Zhu and Wang,

2003)，醛類是因亞麻脂酸 (linoleic acid) 和其它不飽合脂肪酸的氧化所產生。由於氫過氧化物分子內的斷裂重組，會形成環狀過氧化物自由基分子，再與氧分子結合成氫過氧基環過氧化物，進一步裂解生成 MDA。MDA 不僅可作為油脂自氧化反應之氧化程度指標外，亦可與含有胺基酸之分子結合而造成氧化傷害。在生物系統中，脂質過氧化作用受到酵素控制的反應，且是自由基相關過程，產生油脂氫過氧化物，隨後裂解產生多種醛類化合物，如 MDA 和 4-羥基-壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) (Esterbauer et al., 1991; Poli et al., 1987)，造成體內氧化壓力而引發疾病形成 (Romero et al., 1998)，而且脂肪酸氫過氧化物 (hydroperoxides)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 與其它裂解物等，對人體也會造成不良影響，而具有血管毒性 (angiotoxicity)、細胞毒性 (cytotoxicity)、致突變性 (mutagenesis) 或致癌性 (carcinogenesis) (Esterbauer et al., 1991; Poli et al., 1987)。Cajelli 等人(1987)指出 hydroperoxides 中的 4-hydroxynonenal(4-HNE) 在 V79 中國倉鼠肺細胞有直接致突變性關係，而且對 HL-60 細胞是一促分化劑。Natarajan 等人 (1993) 研究結果顯示，4-HNE 能活化磷脂質酶 D (phospholipase D)，而且能影響內皮細胞的訊息轉換。

Wu 等人 (2001) 發現 *trans-trans*-2,4-decadienal (*tt*-DDE) (附圖一)，具有致突變性。在紅白血球 (erythroleukemia) 細胞實驗中，發現 *tt*-DDE 能影響細胞中的麩氨基硫的含量 (Nappez et al., 1996)。最近 Wu 和 Yen 等人 (2004) 更指出，將 50-200 μ M *tt*-DDE 處理人類肺癌細胞 (A-549)，能使癌細胞產生氧化性緊迫和基因毒性之影響。*tt*-DDE 是屬於氣狀污染物中具有揮發性醛類 (aldehydes) (Wu et al., 2001)。同年 Zhu 等人 (2001) 利用中高溫 (190-280 $^{\circ}$ C) 烹飪油 (豬油、菜籽沙拉油、菜籽油和大豆油) 時所產生的醛類，以 GC-MS 分析，結果發現 COF 中也有 *tt*-DDE 存在，而且它在四種烹飪油的加熱溫度不同；在菜籽油和豬油加熱達 230-240 $^{\circ}$ C，在菜籽沙拉油加熱到

達 270-280°C，在大豆油加熱到 190-200°C 會產生 *tt*-DDE，結果顯示 *tt*-DDE 是 COF 中含量很高的醛類之一。

IV. Benzo[a]pyrene 之生物毒性、基因毒性與致癌性

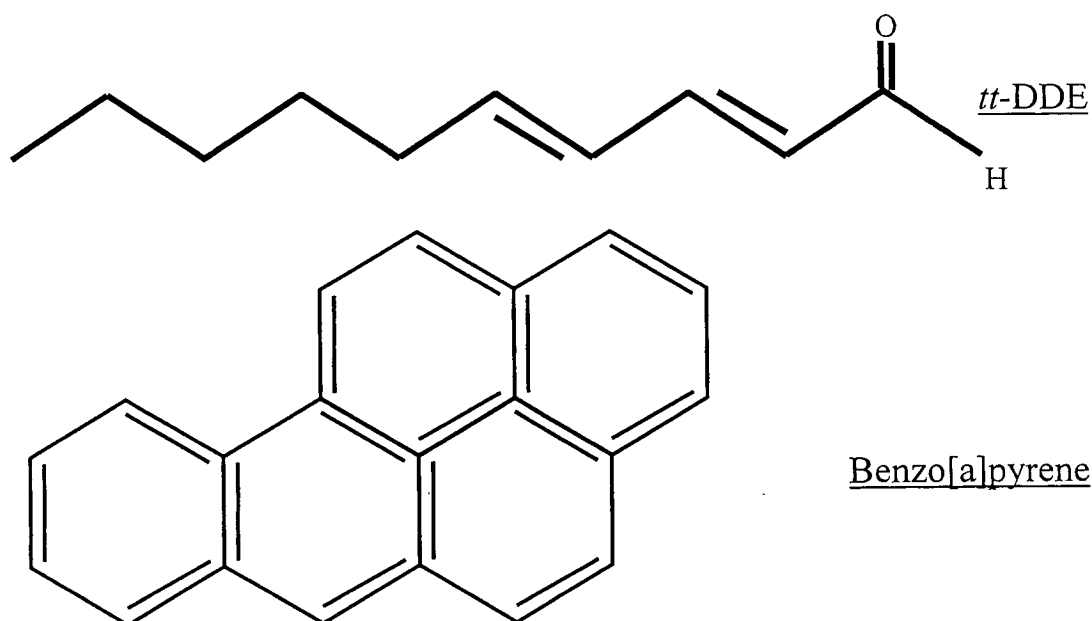
Benzo[a]pyrene 是多環芳香族碳烴化合物中的成員之一（附圖一），PAHs 為兩個或兩個以上的苯環所構成的線狀、角型或團狀的化學結構物，具有穩定的化學結構，但環境中的微生物很容易將它分解，國際癌症研究中心於 1983 年，將 B[a]P 歸類為 2A 類極可能人類致癌物質。B[a]P 存在烹飪時產生的油煙、吸煙時產生的煙霧懸浮微粒中、汽車排放的廢氣、火葬場或焚化爐排出的廢氣中（Perera, 1981; Yang and Chen, 2004），Zhu 等人於 1999-2000 年間偵測中國杭州主要公路附近之空氣，測得空氣中 B[a]P 含量為 0.108 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ （Zhu and Liu, 2001），之後他們偵測六間中式家用廚房及四間中式商業用廚房之空氣，結果得知商業用廚房空氣中 PAH 含量為 17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，以 3 環及 4 環的分子為主，而五環的 B[a]P 含量為 0.15- 0.44 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ；家用廚房空氣中 PAH 含量為 7.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，以 2 環及 3 環的分子為主，而五環的 B[a]P 含量為 0.0061-0.024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ （Zhu and Wang, 2003），此外，他們還偵測吸煙者與非吸煙者居所，發現吸煙者家中室內之空氣 B[a]P 含量比非吸煙者高 67%（Liu et al., 2001）。1994 年時 Li 等人偵測餐廳廚房的空氣，測得 B[a]P 含量為 0.49 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ （Li et al., 1994）。1999 年時 Chiang 等人以氣相層析質譜儀偵測台灣家庭主婦日常烹飪時所使用的油，這些油加溫至 250°C 經 30 分鐘，偵測油煙中 B[a]P 含量，發現 B[a]P 含量分別為：紅花籽油 22.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、蔬菜油 21.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、玉米油 18.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ （Chiang et al., 1999）。流行病學的調查指出人類長期吸煙暴露於 B[a]P 的環境下，會增加罹患肺癌、膀胱癌、乳癌的機率（Mastrangelo et al., 1996）。動物實驗研究指出，小鼠長期皮下注射 B[a]P 會造成肝臟、肺臟、胃及淋巴組織產生腫瘤（Vesselinovitch et al., 1975）；短期

大量口服 B[a]P 的小鼠 (125mg/kg/day; 5 天), 停止餵食 B[a]P 後 41 週, 發現肺臟、前胃、肝臟、脾臟、食道、舌及皮膚均有腫瘤的形成 (Hakura et al., 1998)。

V. 研究目的

臺灣女性吸煙比率低於 10%, 但女性肺癌在女性惡性腫瘤的死亡中卻排名第一, 台灣有 85% 女性肺癌病患並無吸煙。許多研究或流行病學指出, 台灣女性罹患肺癌可能與長時間暴露廚房 COF 有關。在過去研究結果已知, 烹飪油加熱過程中會產生多種污染物, 其中在花生油油煙中分析具有突變性的醛類, 發現其中含量最高的成分是 *trans-trans*-2,4-decadienal (*tt*-DDE), 且已知 COF 中的致突變物以 PAHs 為主, 而 Benzo[a]pyrene 是 PAHs 中的成員之一, 因此, 本研究之目的在於探討暴露於 *tt*-DDE 及 B[a]P 對人類氣管上皮細胞 (BEAS-2B), 觀察這些環境污染物對肺臟細胞之影響; 進一步觀察 vitamin C 和 NAC 抗氧化劑能否抑制 *tt*-DDE 造成之生物反應, 以了解 vitamin C 和 NAC 抗氧化劑是否有預防暴露於 COF 引起之台灣女性肺癌形成之可能性; 另外, 探討雌性素與 BaP 的交互作用。

附圖一、*tt*-DDE 與 B[a]P 之結構



材料與方法

一、細胞培養 (cell culture)

BEAS-2B 細胞株以 LHC-9 細胞培養液培養。將細胞株置於含 5% CO₂ 的 37°C 恆溫培養箱內培養，每三天更換一次新鮮的培養液，每株細胞均間隔四~五天便須分盤培養。每次分盤細胞株培養密度為 5×10^5 個細胞/10 公分培養皿，約四~五分滿。

二、RNA 抽取

倒掉舊 medium，在 6 cm dish 加入 0.5 ml TRI reagent/ dish，於室溫下靜置 5 分鐘，吸出移至微量離心管中，加入 100 μ l 的 chloroform，激烈震盪混合後於室溫靜置 15 分鐘，以 4°C 離心 12,000xg (Eppendorf Centrifuge 5415 R) 15 分鐘，將上層透明液吸出移至新的乾淨的微量離心管中，再加入等量的 isopropanol 混合均勻，並靜置於 -20°C 30 分鐘，以 4°C 離心 12,000xg 10 分鐘，除去上清液，加入 1 ml 75% 酒精混合均勻；以 4°C 離心 8,000xg 5 分鐘，除去上清液並風乾；再加入適量的 DEPC-H₂O (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)，約 15 μ l DEPC-H₂O，置於冰上並以分光光度儀 (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec[®] 2100 pro) 測其 O.D.。

三、RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction)

製備互補 DNA (cDNA): 混合 3 μ g 的 total RNA、1 μ g 的 oligo (dT) 及 DEPC-H₂O，共 12 μ l，加熱 70°C 15 分鐘破壞 RNA 二級結構後，立即置於冰上，接著加入 8 μ l 緩衝溶液 (1 mM dNTP, 1X MMLV RT buffer, RNase inhibitor 1U, MMLV Reverse transcriptase 10U) 在 37°C 加熱一小時，將 mRNA 反轉錄成 cDNA，最後再以 95°C 加熱 5 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 cDNA (total 20 μ l) 保存於 -20°C。

四、定量 PCR (Real-time RT-PCR)

(一) 儀器：ABI Perkin Elmer Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)，以光纖管即時紀錄每一個cycle的螢光訊號，來定量經由PCR放大的基因片段，能偵測500 nm至660 nm範圍之螢光。

(二) 試劑組：

1. SYBR[®] Green PCR kit，為一種 DNA-binding dye，PCR 反應進行時，能嵌入雙股 DNA minor-groove，產生螢光，機器記錄每個 cycle 數所產生的螢光值，形成 sigmoidal-shaped amplification plots，當螢光值到達閾值(threshold)時，會紀錄其 cycle 數，稱為 C_T (threshold cycle)值。
2. TaqMan[®] Universal PCR kit，除了 PCR kit 外，必須再另外合成一條能專一地辨識標的基因的 probe，probe 的 5' 必須標示高能階的螢光物質(reporter dye)，例如 FAM，而 probe 的 3' 必須標示低能階的螢光物質(quencher dye)，例如 TAMRA，當 PCR 反應進行，DNA polymerase 開始聚合作用而遇到 probe 這個障礙物，此時 DNA polymerase 會發揮 5'-3' exonuclease 的作用而將 probe 由 5' 逐一切除，此時 probe 5' 的 reporter dye 便與 3' 的 quencher dye 分離，而發出螢光，反之，若 PCR 反應未進行，probe 5' 的 reporter dye 的能量會被 3' 的 quencher dye 給吸收，因此機器偵測不到 reporter dye 的螢光訊號。機器紀錄 C_T 值的方式同 SYBR。

Assay on demand，這是 Applied Biosystems 所發展出較方便快速的簡易試劑組，此試劑組將特定基因的 primer 和 probe 混合在一起，序列及濃度則未公開，使用時只需稀釋 20x 即可。試劑組和反應原理同 TaqMan[®] Universal PCR kit。

(三)方法：此實驗取由 3 μg RNA 製備成 20 μl 的 cDNA 當 template，與 primer 混合均勻後，上機。測 *GAPDH* 時，將 cDNA 稀釋 100 倍；測量 *COX-2*、*IL-1 β* 、*IL-8*、*p27*、*p21* 和 *p57* 基因時，cDNA 稀釋 10 倍。每個反應管總體積 25 μl :RNase-free H_2O 3.5 μl ，TaqMan mixture 12.5 μl ，primer 2 μl ，probe 2 μl ，template DNA 5 μl 。條件：50°C 2 分鐘，95°C 10 分鐘，60°C 1 分鐘，重複 40 循環。

五、MTT assay

此方法之原理在於測粒腺體內膜去氫酶(dehydrogenase)之活性高低來代表具有該去氫酶之細胞活性變化。反應中外加之 tetrazolium salt (MTT)的環狀結構可以被粒腺體內膜的去氫酶所破壞，造成原本黃包之 MTT 轉變成紫色的 formazan。當反應結果呈色越深，表示該反應中去氫酶之細胞活性越高。而當呈色越淺，代表去氫酶之細胞活性越低。

將細胞以 10,000 個/well 種於 48 well plate 中培養 24 小時後加藥，置於 37°C 培養 48 小時，時間到達之後去除上清液，加入 500 μl MTT 溶液 (MTT 濃度為 1 mg/ml 溶於培養液)，置於 37°C 避光條件下培養 4 小時，之後以 400xg 離心 7 分鐘，去除上清液。因 formazan 不溶於水，最後以每個 well 加入 500 μl 之 DMSO 作為溶劑來溶解 formazan 使細胞溶解並呈色，置於 shaker 震盪 10 分鐘，以螢光測定儀分析儀於波長 535 nm 條件下測定吸光值。

六、cDNA microarray

(一)製備 Biotin-labeled cDNA

混合 3 μg 的 total RNA、3 μl Buffer 補 RNase free H_2O 至 10 μl 後，加熱 70°C 3 分鐘破壞 RNA 二級結構後降溫至 42°C 2 分鐘，加入 RT-biotin 標定緩衝溶液(4 μl Buffer BN (SuperArray kit)、2 μl

Biotin-16-dUTP (Roche)、2 μ l RNase free H₂O、2 U RNase inhibitor 及 10 U MMLV Reverse transcriptase 共 10 μ l) 於 42°C 反應一小時，將 mRNA 反轉錄成 cDNA 並標定 Biotin，加入 2 μ l buffer C (SuperArray kit) 及 2 μ l buffer D (SuperArray kit) 反應 68°C 20 分鐘，再加入 25 μ l Buffer E (SuperArray kit) 68°C 10 分鐘終止反應。

(二) 雜交以及偵測

預先將 hybridization buffer (SuperArray kit) 隔水加熱至 60°C，並將 salmon sperm DNA 置於 100°C 5 分鐘置於冰上，而 array membrane 以 DEPC-H₂O 潤濕並置於冰上備用。吸 3 ml/sample 的 hybridization buffer，置於 15 ml 離心管，並加入 100 mg/ml 之 salmon sperm DNA。將 array membrane 浸泡於 2 ml 之 hybridization buffer 置於 hybridization cyclinder 60°C pre-hybridization 1~2 小時。將標定完成之 44 μ l cDNA 加入含有 salmon sperm DNA 之 750 ml hybridization buffer，並將 array membrane 浸泡其中，並於 hybridization oven 反應隔夜（至少 16 小時）。第二天將 hybridization buffer 去除，並加入 5 ml 之 2X washing solution 於 60°C cyclinder 中以 20~30 rpm 洗 18 分鐘兩次，再以 2X washing solution 洗一次。Blocking 時加入 2 ml 之 GEAblock solution Q 並於離心管中於室溫下旋轉 20~30 rpm-40 分鐘。blocking 的同時，預先將 Solution Q 及 5X Buffer F (SuperArray kit) 於 water bath 中預熱至 37°C。以滅菌水將 5X Buffer F 稀釋成 1X，並將 AP 以 2 ml 之 1X Buffer F 以 1:7500 的比例稀釋製成 binding buffer。將 solution Q 去除後，加入 2 ml binding buffer 於室溫下旋轉 5~10 rpm 反應 10 分鐘。之後以 4ml 1X Buffer F 洗三次，每次 20~30 rpm 5 分鐘。加入 3 ml buffer G 潤濕 5 分鐘 20~30 rpm 兩次，加入 1 ml 之 CDP-star chemiluminescent substrate，震盪後置於室溫下 20~30 rpm 反應 5 分鐘，倒掉 CDP solution 後以塑膠投影包好並於暗房中與 X-光底片 (FUJI medical X-ray film) 壓片約 30 秒至 1 分鐘。並用螢光分析儀 (FUJIFILM

Intelligent Dark Box) 偵測 Fluorescence intensity 後，以 Fujifilm ImageGauge V3.46 擷取影像，利用 ScanAlyze 影像轉檔程式後，再利用 GEArrayAnalyzer 程式定量。將 tt-DDE 及 DMSO 處理之 sample 表現量分別以 array membrane 中之 house keeping gene (GAPDH、Actin、PPIA、RPL13A) 表現量標準化求得相對基因表現量，將 tt-DDE 處理之相對基因表現量除以 DMSO 處理之相對基因表現量後，比較各細胞週期因子表現改變之情形，當基因相對表現量較 DMSO 組增加 3 倍或減少超過 0.3 倍時，才認定為表現情形有明顯差異。

七、氧化性緊迫之偵測

細胞中過氧化物生成採用 2',7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-dA) 捕捉活氧化物產生螢光反應，利用流式細胞儀偵測分析細胞內螢光產物之強度。細胞種入 6 公分 plate 加藥處理 24 小時後，待細胞生長至七分滿時，加入含 50 μ M DCF-dA 之 medium 於培養 37°C 培養箱培養 30 分鐘，之後以 1xPBS 清洗兩次，並加入 1 ml 1xPBS 將細胞刮下，以 800 rpm (KUBOTA2010) 低速離心 5 分鐘，沉澱細胞加入 1ml PBS 混合均勻後，以流式細胞分析儀 (BECTON DICKINSON FACSCalibur) 偵測每個細胞中螢光強度 (Ex/Em=505 nM/535 nM)，並以 WinMdi 軟體分析細胞中氧化性緊迫的情形。

八、Glutathione S-transferase (GST) 酵素活性測定

(一) 製備細胞質均質液

細胞種入 10 公分 plate 中，經加藥處理後，待細胞生長至八、九分滿時，以 1xPBS 緩衝液清洗兩次，並加入 50 mM Tris-sucrose buffer (50 mM Tris, 250 mM sucrose, pH=8.0) 將細胞刮下，置於 1.5 ml 微量離心管中，以超音波 (SONIFIER 250 購自 BRANSOM, U.S.A) 將細胞震破，將 Sonicator 之 Output control: 調整到 5; Duty cycle: 調整到 30%，將含有 Tris-sucrose buffer 之 sample 以 10 sec/once 打兩次，

並於 4°C 12000 rpm (HERMLE Z 323k Centrifuge) 離心 10 分鐘後，取上清液並以 BSA protein assay 定量蛋白量濃度，細胞均質液保存於 -20°C，且過程需完全於冰上操作。

(二)BSA 蛋白定量法

首先以 1 : 50 之比例混合 BCA reagent A 和 reagent B 成為 BCA working reagent，並取待測物 5 μ l 與標準品 (1 μ g/ μ l BSA) 2.5 μ g、5 μ g、10 μ g、15 μ g 與已經稀釋的 1 ml BCA working reagent 混合均勻後置於 37°C 反應 30 分鐘，以分光光度儀 (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec[®] 2100 pro) 於波長 562 nm 測吸光值，再利用線性迴歸分析與標準品 BSA 比較以求得待測物之蛋白濃度 (μ g/ μ l)。本實驗方法用於樣品中含有 glycerol，SDS detergent 或 DTT 時 (若樣品中含 2-mercaptoethanol 時則不可用此方法，所以必須待測完蛋白後再加 10 %之 2-mercaptoethanol)。

(三)Glutathione S-transferase activity assay

取細胞均質液部分 20 μ l 與 80 μ l 的 20 mM potassium phosphate buffer (pH.=7.0)混合後，分別再加入 880 μ l 的 1 mM glutathione (GSH 溶於 100 mM potassium phosphate buffer, pH=6.5)，和 20 μ l 的 50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, 10 mg 溶於 1 ml 100% ethanol, 需避光)，混合均勻後利用可見光光譜儀分析，在 5 分鐘內每隔 1 分鐘，於波長 340 nm 測吸光值，再利用 BSA 蛋白定量法所得的線性迴歸分析，而求得相對酵素表現量。其活性單位代表是每 mg 的蛋白在每分鐘所代表多少 μ mole (μ mole/min/mg)。Glutathione S-transferase (GST) 是生物體內的一種第二相(phase II)酵素，它主要的功能是在一些化學物質結構中再加上一個 glutathione 的官能基以增加其親水性，以利於其由尿液排除，是一個解毒機制。

九、Glutathione (GSH) assay

(一) 製備細胞質均質液

BEAS-2B 細胞種入 10 公分 plate 中，經加藥處理後，待細胞生長至七、八分滿時，以 1xPBS 緩衝液清洗兩次，並加入 50 μ l 的 50 mM MES (glutathione assay kit)，以 rubber policeman (刮勺) 刮下細胞並置入 0.5 ml 微量離心管。從超音波震破細胞後，於 4°C 10,000 xg 離心 15 分鐘，取上清液部分作去蛋白步驟。

(二) 去蛋白(Deproteination)

上清液與等體積之 MPA reagent (1 g metaphosphoric acid 溶於 10 ml 二次水) 混合，在室溫反應 5 分鐘，於 4°C 2,000 xg 離心 2 分鐘，小心取上清液後，平均體積並置入 0.5 ml 微量離心管，分別作 GSSG 和 Total GSH (含 GSSG 和 GSH)。GSSG 測量法是加入 50 μ l/ml 的 4 M TEAM reagent (531 μ l triethanolamine 溶於 469 μ l 二次水)，混合均勻後，再加入 10 μ l/ml 的 1 M 2-vinylpyridine (108 μ l 2-vinylpyridine 溶於 892 μ l ethanol) 混合，在室溫反應 60 分鐘。而 Total GSH 只需加入 50 μ l/ml 的 4 M TEAM reagent 混合均勻後，就能作下一步驟。在反應 60 分鐘結束前 10 分鐘，需配置每 well 含 150 μ l 的緩衝溶液 (MES buffer, reconstituted Cofactor Mixture, reconstituted Enzyme Mixture, water and reconstituted DTNB (Glutathione EIA assay kit))。GSSG 標準品由 Glutathione assay kit 提供。製備 GSSG 標準品的標準檢量線方式如下:先取 0 μ l、40 μ l、80 μ l 及 160 μ l 的 GSSG 標準品加入 MES buffer 500 μ l、460 μ l、420 μ l、340 μ l 混合均勻。GSSG 標準品與 MES buffer 依不同濃度稀釋成 0 μ M、2 μ M、4 μ M 及 8 μ M 每個濃度均有兩重覆並以 50 μ l/well 加入 96 孔盤內，而且 Assay 時取 50 μ l 已製備 GSSG 或 Total GSH 的 sample 也置於 96 孔盤中，並加入 150 μ l 的緩衝溶液反應 25 分鐘，偵測於波長 405 nm 之吸光值。

十、PGE₂ 之測定

本實驗使用 Cayman 之 Prostaglandin E₂ EIA kit 操作方法，首先細胞以 5×10^4 於 24well plate 培養 24 小時後，加藥處理 72 小時，收集培養液。PGE₂ 標準品由 Prostaglandin E₂ EIA kit 提供。製備 PGE₂ 標準品的標準檢量線方式如下：先取 1000 μ l EIA buffer 將粉末狀的 PGE₂ 標準品充分溶解，濃度為 1,000 pg/ml，再分裝儲存於 -20°C 冰箱中備用，並避免反覆解凍冷凍。將 1,000 pg/ml 的 PGE₂ 標準品與 cell medium diluent 依不同濃度系列稀釋成 500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.2 pg/ml 及 15.6 pg/ml、7.8 pg/ml。每個標準品濃度均有兩重覆並取 50 μ l 置於 96 孔盤內，而且 Assay 時取 50 μ l/well 細胞培養液也加入 96 孔盤內，且加入 50 μ l PGE₂ Tracer(6ml EIA buffer 溶於 100 dtn PGE₂ Tracer)及加入 50 μ l PGE₂ Monoclonal antibody (6ml EIA buffer 溶於 100 dtn PGE₂ Monoclonal antibody)在 4°C 反應 18 小時後，利用 1x wash buffer (用二次水稀釋 5 倍使用)清洗 5 次，每次 200 μ l/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。之後加入 200 μ l 的 Ellman's reagent，在室溫反應 1~1.5 小時。反應 1~1.5 小時後，並以波長 405nm 和 420nm 的吸光值測量。其作用方式同上所述，便可計算得到 PGE₂ 標準品的公式，並將細胞上清液經 ELISA 分析所得吸光值帶入標準品的公式，即可換算出細胞受刺激後所誘發之 PGE₂ 的量。

十一、統計分析

實驗結果經由三重覆或三次以上個別的實驗得到平均值及標準差，而量化的結果經由 Student's t-test 或者是 one way analysis of variance (ANOVA)加以分析，並檢測其差異性。Student's t-test 主要是只存在單一變數時分析兩組間的差異性，而 ANOVA 則是有多重變因存在時分析這些變因是否彼此間是否有交互影響。分析 P 值小於 0.05 代表具有統計上的意義，濃度的對數值和基因的 induction fold 之相關性以 Pearson correlation 檢測之。

結果

探討短期處理 *tt*-DDE 對 BEAS-2B 細胞其氧化緊迫之影響

根據 Wu 和 Yen 等人之報導指出，人類肺癌細胞 A549 經 *tt*-DDE 處理後，導致細胞內氧化緊迫增加。因此，首先，本研究觀察 BEAS-2B 細胞在處理 0.1 μM 、1 μM 及 5 μM *tt*-DDE 後，是否會增加細胞內氧化緊迫。先將 BEAS-2B 細胞以 0.1 μM 、1 μM 及 5 μM *tt*-DDE 處理 10 分鐘後，利用流式細胞儀分析細胞內氧化性緊迫之程度。實驗結果顯示（表一），當處理 0.1 μM 、1 μM 及 5 μM *tt*-DDE 後，螢光之表現量明顯上升，分別為 110.68%、121.92% 以及 179.39%（以 DMSO 為對照組），證實 *tt*-DDE 會快速增加細胞中氧化緊迫，且呈劑量反應關係。另外，因觀察到 *tt*-DDE 會增加細胞內氧化性緊迫，接著探討是否改變 glutathione 的氧化還原作用。BEAS-2B 處理 0.1 μM 、1 μM 及 5 μM *tt*-DDE 10 分鐘後，還原態與氧化態 glutathione 的比例（GSH/GSSG）顯著降低，與控制組（5.12）相比，比例減少至 2.56、1.73 與 0.23。因此，推論 *tt*-DDE 除了增加細胞氧化性緊迫外，亦促使 GSH 氧化成 GSSG。

探討抗氧化劑（NAC、Vitamin C）對長期處理 *tt*-DDE 之 BEAS-2B 細胞其生長能力之作用

欲探討經由 *tt*-DDE 所引起的氧化性緊迫是否會影響細胞之生長能力，因此，利用 MTT assay 進行分析。結果發現，長期（45 天）處理 1 μM *tt*-DDE 有促進細胞生長之現象，約上升 123.83%，然而，在 *tt*-DDE（1 μM ）與抗氧化劑 vitamin C（2 mM）共同處理下，*tt*-DDE 促進細胞生長之作用明顯降低至 97.96%（表二）。為了進一步證明氧化性緊迫與 *tt*-DDE 促進細胞增生有關係，在實驗中加入另一種抗氧化劑 NAC（N-Acetyl-L-Cysteine），將 0.5 mM NAC 的與 1 μM *tt*-DDE 共同處理 7 天後，繼續單獨處理 1 μM *tt*-DDE 直到 45 天。由於，單

獨長期處理 NAC 會使細胞增生，故一共只處理 7 天的累積量。結果發現，長期（45 天）處理 1 μ M *tt*-DDE 有促進細胞生長之現象，約上升 132.85%，然而，當 NAC 與 *tt*-DDE 共同處理下，*tt*-DDE 促進細胞生長之作用明顯降低至 83.34%（表二）。此結果與 *tt*-DDE 共同處理 vitamin C 的實驗結果相同。因此，推測 *tt*-DDE 是經由氧化性緊迫，進而促進 BEAS-2B 細胞生長。

探討 BEAS-2B 細胞長期處理 *tt*-DDE 其 p27 基因與蛋白表現之作用

證實經 *tt*-DDE 處理 45 天後，細胞生長速率及氧化性緊迫皆上升，我們推測此現象可能與癌症相關基因表現有關。本實驗利用 cancer pathway 及 inflammatory cytokines 專一的 cDNA array 進行分析，結果發現 p27 mRNA 量有明顯變化。與 p27 為同一家族的基因有 p57、p21，因此，亦探討此兩基因的表達。我們進一步以 real-time RT-PCR 確定 cDNA array 的結果。經 *tt*-DDE 處理 45 天後，p27mRNA 表達量明顯降低約 40%（圖一，A），相反地，p57及 p21mRNA 表達量並無顯著差異（圖一，B，C）。另外，以 Western blot 分析 p27 蛋白表現，經 *tt*-DDE 處理 45 天後，結果 p27 蛋白表現降低，約為控制組的 0.64 倍（圖一，D）。以上結果證明，長期處理 *tt*-DDE 會抑制 p27 的表現。

探討抗氧化劑（NAC、Vitamin C）對長期處理 *tt*-DDE 之 BEAS-2B 細胞其 p27 基因表達之作用

從上述結果得知，當共同處理 *tt*-DDE 與抗氧化劑（NAC、vitamin C）會抑制其誘發的細胞增生作用（表二），另外，經長期處理 *tt*-DDE 會降低 p27 的表現（圖一），而 p27 為調控細胞週期的基因之一。因此，本實驗擬探討當長期處理 *tt*-DDE 及共同處理抗氧化劑（0.5 mM NAC、2 mM vitamin C），對 p27 基因的表達作用之影響。圖二結果

顯示，經 1 μ M *tt*-DDE 處理 45 天後，*p27* mRNA 的表達量顯著降低。當 1 μ M *tt*-DDE 與 NAC 或 vitamin C 共同處理下，會抑制 *tt*-DDE 的作用，也就是 *p27* mRNA 表達量回復且趨於正常值。以上結果證明長期處理 *tt*-DDE 對 *p27* 的影響是具有專一性，且 *tt*-DDE 可能經由增加細胞內氧化性緊迫，進而降低 *p27* mRNA 量的累積，促使 BEAS-2B 細胞生長，然而 *tt*-DDE 所造成的這些現象皆因抗氧化劑的使用受抑制。

在 BEAS-2B 細胞中，觀察 BaP 和 E2 對 IL-8, IL-1 β cytokines, COX-2 基因之表現

將 BEAS-2B 細胞處理 DMSO、10 nM E2、10 μ M BaP、10 μ M BaP+10 nM E2，經 24 小時後，抽取 RNA，反轉成 cDNA，以 Real-time PCR 定量 IL-8, IL-1 β 及 COX-2 基因之表達程度。圖三實驗結果顯示，BEAS-2B 細胞在單獨處理 10 μ M BaP 及 10 μ M BaP+10 nM E2 的條件下，IL-8, IL-1 β 及 COX-2 基因表達量明顯增加，且 10 μ M BaP+10 nM E2 所誘導 IL-8, IL-1 β 及 COX-2 基因表達的量，相較於單獨處理 10 μ M BaP 的表達量要高。反之，單獨處理 E2 (10 nM)，IL-8, IL-1 β 及 COX-2 基因表達量並無差異。因此，證實處理 E2 會促進 BaP 增加 IL-8, IL-1 β 及 COX-2 基因的表達程度。

在 BEAS-2B 細胞中，觀察 BaP 和 E2 對 PGE-2 蛋白之表現

將 BEAS-2B 細胞處理 DMSO、10 nM E2、10 μ M BaP、10 μ M BaP+10 nM E2、10 μ M BaP+10 nM E2+10 μ M DMF、10 μ M BaP+10 nM E2+100 nM ICI，經 72 小時後，收集培養液，進行 ELISA 分析，觀察從細胞中所分泌出 PGE-2 蛋白量。圖四實驗結果顯示，BEAS-2B 細胞在處理 10 nM E2 及 10 μ M BaP+10 nM E2 的條件下，PGE-2 蛋白表現量明顯增加。反之，單獨處理 BaP (10 μ M)，PGE-2

蛋白表現並無差異。另外，亦發現處理 $10\ \mu\text{M}$ BaP+ $10\ \text{nM}$ E2+ $10\ \mu\text{M}$ DMF 及 $10\ \mu\text{M}$ BaP+ $10\ \text{nM}$ E2+ $100\ \text{nM}$ ICI 後，PGE-2 蛋白的分泌量會降低。結果證實 BaP 和 E2 是經由活化 AhR 和 ER 使 PGE-2 蛋白的表現增加。

討論

目前很多流行病學研究結果顯示，台灣地區女性肺癌的發生可能與經常暴露烹飪油煙有關(Gao et al., 1987; Lin et al.1993)。已知烹飪油經加熱後，食物中的多不飽和脂肪酸進行氧化，會產生多種醛類，其中以 *trans,trans*-2,4-decadienal (2,4-De or *tt*-DDE)的含量最高及突變性最強(Wu et al., 2001)。接著有研究報告更證實 *tt*-DDE 在肺癌細胞會造成氧化性傷害和 DNA 損傷(Wu and Yen, 2004)。本論文之目的為了解 *tt*-DDE 在人類氣管上皮細胞的生物作用。首先我們假設長期以低劑量的 *tt*-DDE (0.1 或 1 (w)M)處理人類氣管上皮細胞 (BEAS-2B)，應能使細胞轉型進而癌化。本研究結果顯示，長期以 1 (w)M *tt*-DDE 處理 BEAS-2B 細胞在 29-32 天後，增加細胞內氧化性緊迫及細胞生長速率，進而在 45 天降低 p27 mRNA 累積量，但並不會使細胞轉型。已知許多腫瘤促進劑會增加細胞生長速率、細胞內氧化緊迫及細胞激素的分泌。因此推測 *tt*-DDE 經由增加細胞內氧化緊迫，而具有腫瘤促進的作用。

許多研究證據顯示，癌症的發生與細胞週期有密切關係，更有研究結果顯示，當肺細胞受氧化性傷害或細胞激素蛋白刺激下，能抑制細胞週期的 *p21* 家族蛋白的合成，而促使細胞通過 G1 期進入 S 期 (Ardies, 2003)。*p21* 家族包括 *p21*, *p27*(Kip1), and *p57*(Kip2) (Hatta and Koeffler, 2002)。*p57*、*p21* 與 *p27* 的功能是相同的，均能抑制 cyclin E 和 cyclin D 活性，使其不能與 Rb 結合(Rb 不能磷酸化)，進而阻止細胞通過 G1 期進入 S 期。本論文結果顯示，*tt*-DDE 並不會影響 *p57* 和 *p21* mRNA 累積量;但是專一性降低 *p27* mRNA 累積量。最近有研究證據顯示，當小鼠肺泡第二型細胞經由有絲分裂物質刺激下使生長速率增加時，會減少 *p27* 蛋白量(Zhang et al., 2004)。故此推測本篇論文中 *tt*-DDE 是經由降低細胞週期的 *p27* mRNA 量，而促進 BEAS-2B 細胞生長。

為了證實 *tt*-DDE 經由增加細胞內氧化緊迫，進而促進細胞生長及細胞激素 mRNA 及蛋白量，我們利用二種抗氧化劑 (Vitamin C 或 NAC) 分別與 1 (ω)M *tt*-DDE 共同處理 BEAS-2B 細胞。結果顯示抗氧化劑能明顯降低 *tt*-DDE 促進細胞生長之作用；相同地，也能防止 *tt*-DDE 降低 *p27* mRNA 累積之作用。許多研究證據顯示，當細胞內氧化緊迫上升時，細胞內的 glutathione 解毒機制會啟動，利用 GST 酵素把細胞內的活性氧減少 (Deneke and Fanburg, 1989; Rahman and MacNee, 2000; van Klaveren et al., 1997)。本研究結果證實，*tt*-DDE 增加細胞內氧化緊迫時，能減少 GSH/GSSG 的比率，但 GST 的酵素活性卻沒有改變，證明 *tt*-DDE 不會改變 GST 的酵素活性。已知 vitamin C 和 NAC 是抗氧化劑，vitamin C 能經由離子交換來抑制脂質氧化 (Halliwell, 1978)，NAC 是 glutathione 的前驅物，增加細胞內 glutathione 的合成，以保護或降低肺臟受氧化性傷害 (Dick et al., 2003; Rhoden et al., 2004)，實驗結果顯示，vitamin C 或 NAC 都能顯著降低 *tt*-DDE 促進細胞增生之作用，因此推測 *tt*-DDE 是經由氧化性緊迫，進而促進細胞生長，並降低對 *p27* mRNA 量的影響。

已有動物實驗結果證實 BaP 較易於雌鼠誘發腫瘤，而雄鼠較不敏感。因此我們假設 BaP 與雌性素發生某種交互作用，而增加雌鼠的敏感性。因為我們發現 *tt*-DDE 於 BEAS-2B 細胞會促進細胞激素的基因表現及分泌，因此也檢測 BaP 與雌性素對細胞激素的基因表現之影響。我們發現雌性素會加強 BaP 促進細胞激素及 COX-2 的基因表現之作用，而 BaP 本身無法增加 PGE2 的分泌，但是與雌性素同時處理後顯著增加 PGE2 的分泌。已知人類肺腺癌組織的 COX-2 表現增加，而且參與多種癌症的發生，因此 BaP and 雌性素促進 COX-2 and PGE2 的作用可能與 BaP 毒性的性別差異有關，值得進一步探討。

結論與建議

1. *tt*-DDE 會增加細胞氧化性緊迫，且促使 GSH 氧化成 GSSG (表一)。
2. *tt*-DDE 會造成細胞內的氧化性緊迫增加，因而促進 BEAS-2B 細胞生長。另外，抗氧化劑(vitamin C 及 NAC)的使用會抑制 *tt*-DDE 的作用 (表二)。
3. 長期處理 *tt*-DDE 會導致 BEAS-2B 細胞內 p27 的表現顯著降低，無論是在基因或是蛋白層次皆得到證實(圖一)。另外，同樣的，抗氧化劑(vitamin C 及 NAC)的使用亦會抑制 *tt*-DDE 的作用(圖二)。
4. E2 會促進 BaP 增加 IL-8, IL-1(l)及 COX-2 基因的表達程度(圖三)。
5. BaP 和 E2 是透過活化 AhR 和 ER 使 PGE-2 蛋白的表現增加(圖四)。

94 年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議

本研究發現烹飪油煙的主要成份之一， tt-DDE,促進肺細胞增生，可能與癌化過程有關。但是給予廣效型抗氧化物,例如 NAC and Vitamin C,可防止 tt-DDE 的作用，因此經常暴露烹飪油煙者多攝取抗氧化物可能減少烹飪油煙對肺臟的傷害。另外一個烹飪油煙中的有毒成分, BaP,會與雌性素發生交互作用，促進細胞激素的作用及 PGE2 的分泌，但是同時處理多環芳香烴受器或雌性素受器均會阻斷 BaP and E2 促進 PGE2 的作用，因此將來進行烹飪油煙之健康效應等研究時應考慮飲食及雌性素使用習慣的影響，或者注意到雌性素與環境因子互相作用進而對健康之影響。

參考文獻

- Berg I, Overvik E, and Gustafsson, JA: Effect on cooking time on mutagen formation in smoke, crust and pan residue from pan-broiled pork. *Food Chem Toxicol* 1990; 28: 421-426.
- Cajelli E, Ferraris A, and Brambilla G: Mutagenicity of 4-hydroxynonenal in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1987; 190: 169-171.
- Chiang TA, Wu PF, Wang LF, Lee H, Lee CH, and Ko YC: Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Mutat Res* 1997; 381: 157-161.
- Chiang TA, Wu PF, and Ko YC: Prevention of exposure to mutagenic fumes produced by hot cooking oil in Taiwanese kitchens. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31: 92-96.
- Chiang TA, Wu PF, and Ko YC: Identification of carcinogens in cooking oil fumes. *Environ Res* 1999; 81: 18-22.
- Chen YC, and Chen BH: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fumes from fried chicken legs. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4162-4167.
- Chen YC, Chiu CP, and Chen BH: Mutagenicity of fumes from fried chicken legs. *J Food Prot* 2003; 66: 1269-1276.
- Dipple A, Pigott MA, Agarwal SK, Yagi H, Sayer JM, and Jerina DM: Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature* 1987; 327: 535-536.
- Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
- Fu PP: Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Rev* 1990; 22: 209-268.
- Fu PP, Qui FY, Jung H, Von Tungeln LS, Zhan DJ, Lee MJ, Wu YS, and Heflich RH: Metabolism of isomeric nitrobenzo[a]pyrenes leading to DNA adducts and mutagenesis. *Mutat Res* 1997; 376: 43-51.
- Hakura A, Sonoda J, Tsutsui Y, Mikami T, Imade T, Shimada M, Yaguchi S, Yamanaka M, Tomimatsu M, and Tsukidate K: Toxicity profile of benzo[a]pyrene in the male LacZ transgenic mouse (MutaMouse) following oral administration for 5 consecutive days. *Regul Toxicol Pharmacol* 1998; 27: 273-279.
- Jeffrey AM, Jennette KW, Blobstein SH, Weinstein IB, Beland FA, Harvey RG, Kasal H, Miura I, and Nakanishi K: Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: structure of a benzo[a]pyrenetetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *J*

- Am Chem Soc* 1976; 98: 5714-5715.
- Kinouchi T, Tsutsui H, and Ohnishi Y: Detection of 1-nitropyrene in yakitori (grilled chicken). *Mutat Res* 1986; 171: 105-113.
- Li S, Pan D, and Wang G: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch Environ Health* 1994; 49: 119-122.
- Liu Y, Zhu L, and Shen X: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air of Hangzhou, China. *Environ Sci Technol* 2001; 35: 840-844.
- Lofroth G, Stensman C, and Brandhorst-Satzkorn M: Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning. *Mutat Res* 1991; 261: 21-28.
- Marnett LJ: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83-95.
- Mastrangelo G, Fadda E, and Marzia V: Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1166-1170.
- Nappez C, Battu S, and Beneytout JL: trans, trans-2,4-decadienal: cytotoxicity and effect on glutathione level in human erythroleukemia (HEL) cells. *Cancer Lett* 1996; 99: 115-119.
- Natarajan V, Scribner WM, and Taher MM: 4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 365-375.
- Poli G, Albano E, and Dianzani MU: The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 117-142.
- Perera F: Carcinogenicity of airborne fine particulate benzo(a)pyrene: an appraisal of the evidence and the need for control. *Environ Health Perspect* 1981; 42: 163-185.
- Ramirez MR, Estevez M, Morcuende D, and Cava R: Effect of the type of frying culinary fat on volatile compounds isolated in fried pork loin chops by using SPME-GC-MS. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 7637-7643.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, and Roma J: Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1229-1234.
- Shields PG, Xu GX, Blot WJ, Fraumeni JF, Trivers GE, Pellizzari ED, Qu YH, Gao YT, and Harris CC: Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 836-841.
- Stephan A, and Steinhart H: Identification of character impact odorants of different soybean lecithins. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 2854-2859.
- Tokiwa H, Nakagawa R, and Horikawa K: Mutagenic/carcinogenic agents in indoor pollutants; the dinitropyrenes generated by kerosene heaters and fuel gas and

- liquefied petroleum gas burners. *Mutat Res* 1985; 157: 39-47.
- Tokiwa H, and Ohnishi Y: Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *Crit Rev Toxicol* 1986; 17: 23-60.
- Vesselinovich SD, Kyriazis AP, Mihailovich N, and Rao KV: Conditions modifying development of tumors in mice at various sites by benzo(a)pyrene. *Cancer Res* 1975; 35: 2948-2953.
- Wen Cheng Y, and Lee H: Environmental exposure and lung cancer among nonsmokers: an example of Taiwanese female lung cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2003; 21: 1-28.
- Wu MT, Lee LH, Ho CK, Wu SC, Lin LY, Cheng BH, Liu CL, Yang CY, Tsai HT, and Wu TN: Environmental exposure to cooking oil fumes and cervical intraepithelial neoplasm. *Environ Res* 2004; 94: 25-32.
- Wu PF, Chiang TA, Wang LF, Chang CS, and Ko YC: Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon contents of fumes from heated cooking oils and prevention of mutagenicity by catechin. *Mutat Res* 1998; 403: 29-34.
- Wu SC, Yen GC, and Sheu F: Mutagenicity and identification of mutagenic compounds of fumes obtained from heating peanut oil. *J Food Prot* 2001; 64: 240-245.
- Wu SC, and Yen GC: Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells. *Toxicol In Vitro* 2004; 18: 571-580.
- Wu-Williams AH, Dai XD, Blot W, Xu ZY, Sun XW, Xiao HP, Stone BJ, Yu SF, Feng YP, Ershow AG, and et al.: Lung cancer among women in north-east China. *Br J Cancer* 1990; 62: 982-987.
- Yang HH, and Chen CM: Emission inventory and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere at a suburban area in Taiwan. *Chemosphere* 2004; 56: 879-887.
- Yang SC, Jenq SN, Kang ZC, and Lee H: Identification of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine in human lung adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions. *Chem Res Toxicol* 2000; 13: 1046-1050.
- Zhu L, and Wang J: Sources and patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons pollution in kitchen air, China. *Chemosphere* 2003; 50: 611-618.
- Zhu LZ, and Liu YJ: Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in arterial street air of Hangzhou. *J Environ Sci (China)* 2001; 13: 8-13.
- Zhu X, Wang K, Zhu J, and Koga M: Analysis of cooking oil fumes by ultraviolet spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4790-4794.

圖 1. 探討 BEAS-2B 細胞長期處理 *tt*-DDE 其 p27 基因與蛋白表現之作用

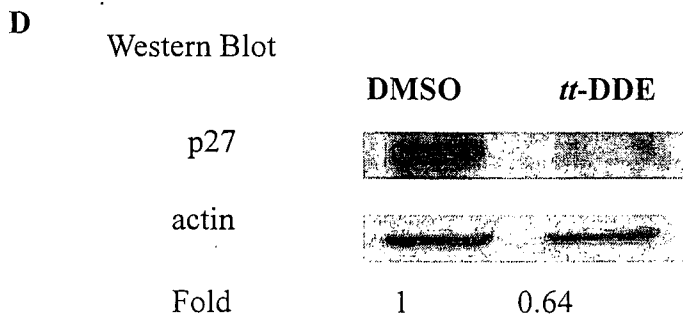
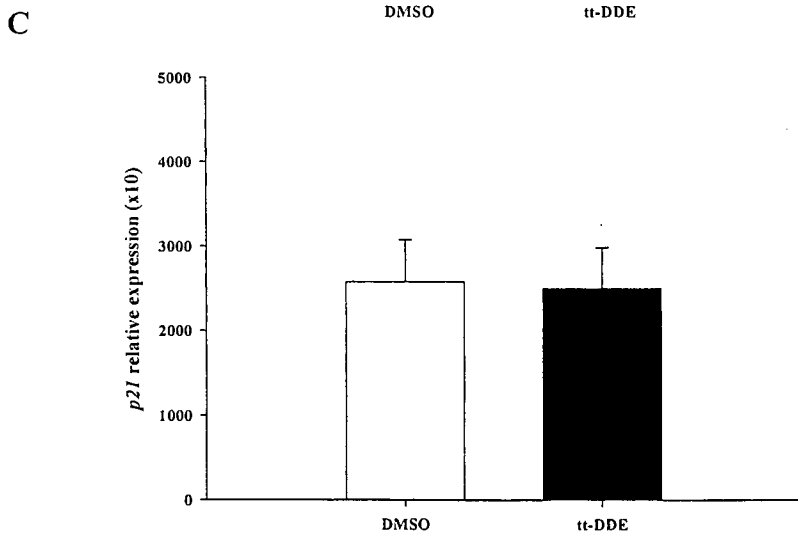
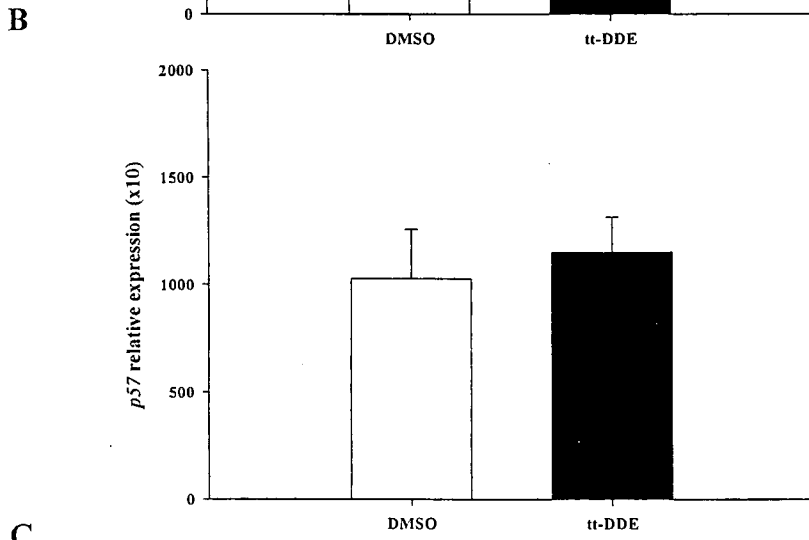
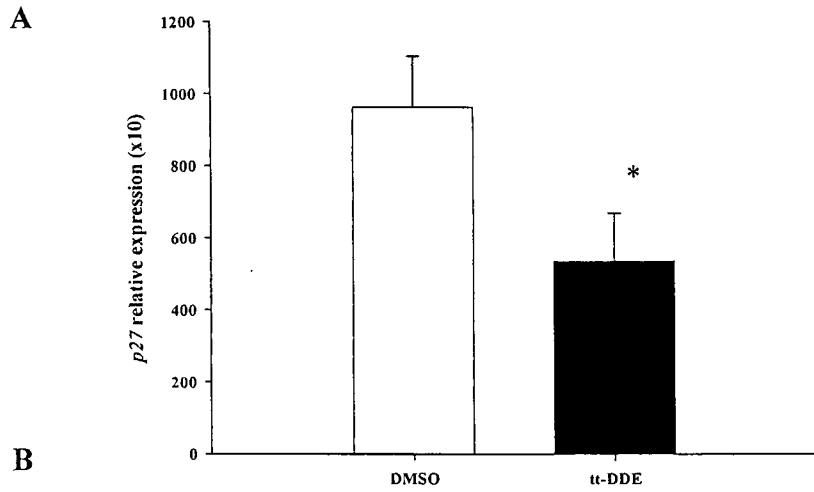
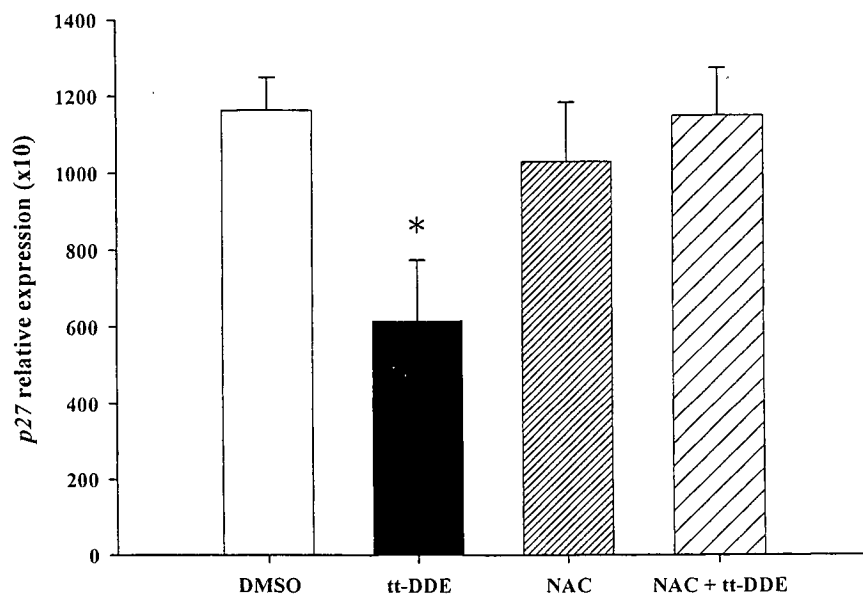


圖 2. 探討抗氧化劑 (NAC、Vitamin C) 對長期處理 *tt*-DDE 之 BEAS-2B 細胞其 p27 基因表達之作用

A *tt*-DDE + 0.5 mM NAC



B *tt*-DDE + 2 mM Vitamin C

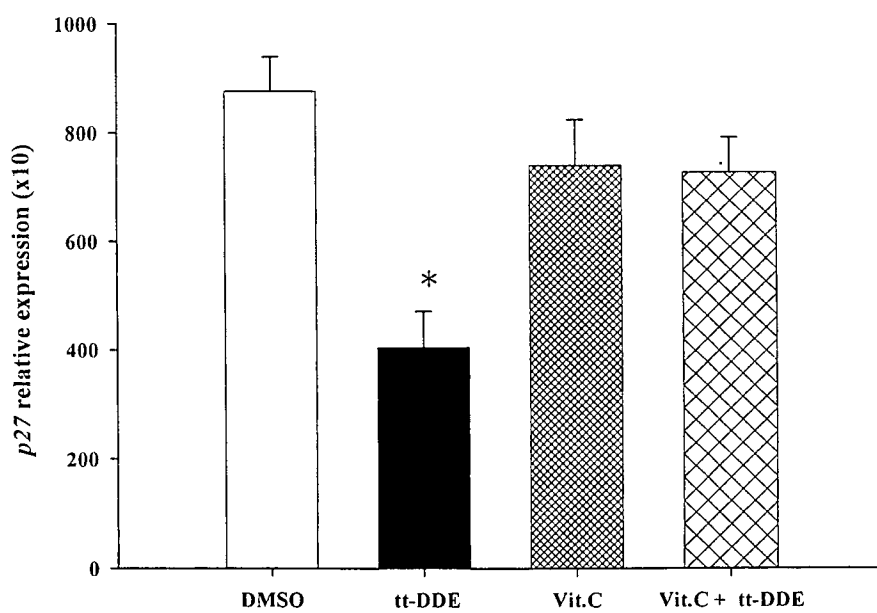


圖 3. 在 BEAS-2B 細胞中，觀察 BaP 和 E2 對 IL-8, IL-1 β cytokines, COX-2 基因之表現

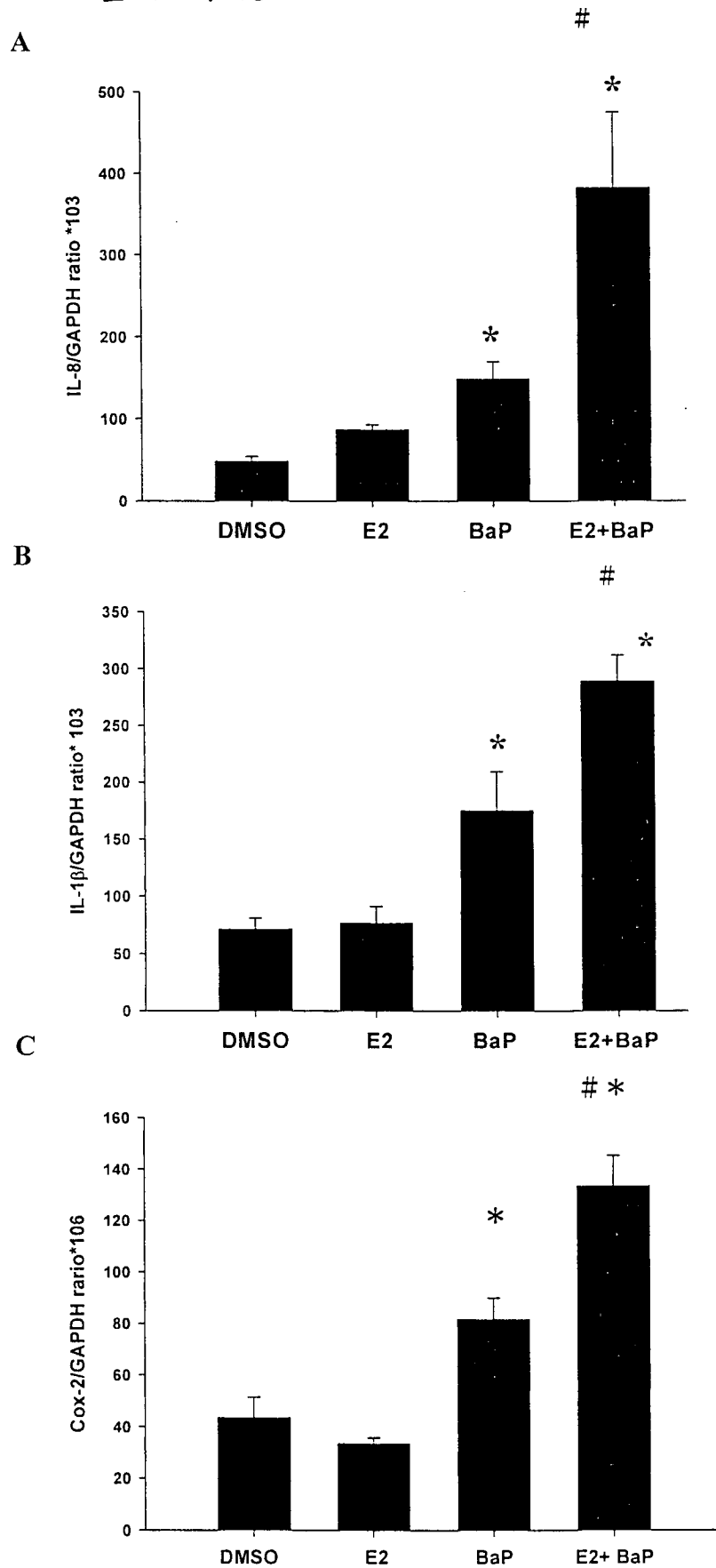


圖 4. 在 BEAS-2B 細胞中，觀察 BaP 和 E2 對 PGE-2 蛋白之表現

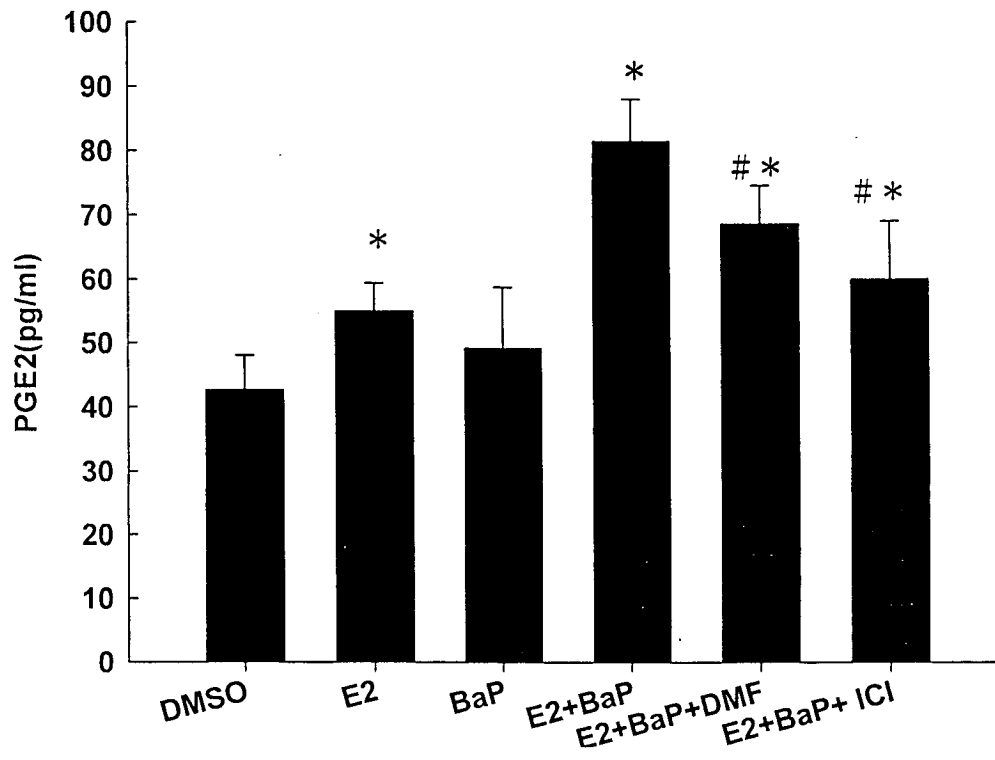


表 1. 探討短期處理 *tt*-DDE 對 BEAS-2B 細胞其氧化緊迫之影響

Treatment	ROS (% of control)	GSH/GSSG ratio
DMSO	100.00 ± 4.63	5.12 ± 0.10
0.1 μM <i>tt</i> -DDE	110.68 ± 2.54*	2.56 ± 0.05*
1 μM <i>tt</i> -DDE	121.92 ± 3.36*	1.73 ± 0.09*
5 μM <i>tt</i> -DDE	179.39 ± 7.81*	0.23 ± 0.11*

tt-DDE 10: treated 10 min

*: Compared with DMSO

Statistical analysis: t-test, $p < 0.05$

表 2. 探討抗氧化劑 (NAC、Vitamin C) 對長期處理 *tt*-DDE 之 BEAS-2B 細胞其生長能力之作用

Treatment	% of control
DMSO	100.00 ± 5.28
1 μM <i>tt</i> -DDE	123.83 ± 2.63*
DMSO + 2 mM Vit. C	99.14 ± 3.09
1 μM <i>tt</i> -DDE + 2 mM Vit. C	97.96 ± 1.37 [#]
DMSO	100.00 ± 6.82
1 μM <i>tt</i> -DDE	132.85 ± 3.65*
DMSO + 0.5 mM NAC	72.94 ± 7.28*
1 μM <i>tt</i> -DDE + 0.5 mM NAC	83.34 ± 11.83 [#]

Vitamin C: treated 45 days

NAC: treated first 7 days only

*: Compared with DMSO

#: Compared with *tt*-DDE only

Statistical analysis: One-Way ANOVA, $p < 0.01$