

第一章 前言

目前全球大約有 20% 的吸煙人口(約 12.5 億)，其中男性大約有 16% (10 億)，女性約 4% (2.5 億)。在台灣的吸煙人口方面，十五歲以上國人吸煙盛行率，男性中有 43.5% 的人幾乎每天吸煙，女性中每天吸煙的比率僅 4.2%⁽¹⁴⁾。而近年來女性吸煙的問題越來越受到重視，尤其是懷孕婦女吸煙及暴露二手煙對於胎兒的影響。吸煙對女性健康的威脅，已隨著女性吸煙人口上升而增加，除了會對呼吸系統及心血管方面造成危害，更會增加罹患惡性腫瘤的危險性⁽³⁾，根據 92 年衛生署所公佈的女性十大癌症死因資料中，女性肺癌死亡排名第一，乳癌和子宮頸癌分佔四、五名⁽²⁰⁾。另外亦有研究指出，懷孕期間吸煙或暴露二手煙會使胎兒生長遲緩，而且新生兒死亡率也增高大約 33%^(23, 26, 28, 30)。

尼古丁是香煙所產生較具代表性的有害物質，一旦吸入體內後，則可能代謝不同尼古丁物質，但由於尼古丁半衰期較短，測量半衰期較長的尼古丁主要代謝物 - 可丁寧(cotinine)是較好的指標^(1, 2, 8)。研究顯示，若婦女懷孕期間吸煙，會導致新生兒尿中及頭髮中可丁寧濃度隨之升高，進而影響胎兒健康^(3, 108, 109)，另外男性吸煙其體內可丁寧之濃度亦與精蟲產生 DNA 損傷有關⁽¹¹⁰⁾。

當環境中污染物包括煙草所含的多環芳香族碳氫化合物 (PAHs) 等有害物質進入人體後，人體會有一系列的代謝解毒機制來轉化排除這些毒物，以保持人體的健康，而解毒能力的大小與個體易感性基因的多型性有關，例如細胞色素 P450 (cytochrome P450) 之異構酵素 CYP1A1 基因屬於第一期之代謝活化酵素，可代謝 PAHs 產生嗜電性中間產物。穀胺基硫轉移酵素 (glutathione S-transferase; GST) 中的 GSTT1 與 GSTM1 為第二期代謝酵素基因，有研究指出同時缺失此兩段基因者，會使罹患肺癌的危險性上升兩倍⁽⁵⁶⁾。N-乙醯基轉移酵素 (N-acetyltransferases; NAT) 的 NAT2 亦為第二期代謝酵素基因，其基因型可分為快型和慢型，研究指出快型與增加結腸直腸癌危險性有相關^(72,73)，慢型與增加膀胱癌危險性有關^(63, 74, 75, 76)，若加上有吸煙習慣則會更增加罹病危險性⁽⁷⁵⁾。

體內若受有害物質 (如 PAHs) 侵襲亦會促使自由基的生成，並會降低抗氧化劑的保護能力⁽³¹⁾，自由基攻擊 DNA 的結果，可能會造成 DNA 突變或斷裂，若無法修復受損的 DNA，則可能造成組織細胞的病變。DNA-protein crosslinks (DPC)、染色體異常 (chromosomal aberration, CA)、姐妹染色分體交換 (sister chromatid exchange, SCE) 及彗星試驗 (comet assay) 都是能夠偵測 DNA 受損情況的方式，其中彗星試驗是一種可以快速簡便檢測出 DNA 損傷程度的實驗技術，過去有研究利用彗星

試驗發現，吸煙者以及暴露於菸草煙塵的工人其 DNA 損傷情況較無吸煙及暴露之工人嚴重⁽⁸²⁾，另有研究將吸煙者及非吸煙者的細胞經過紫外光照射之後，發現吸煙者 DNA 受損情況較為嚴重⁽⁸⁷⁾。

本研究目的：

1. 藉由採樣及問卷所蒐集的資料，探討孕婦吸煙及二手煙暴露與其體內可丁寧濃度之相關。
2. 探討 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 及 NAT2 基因之對偶基因頻率及基因型分布。
3. 以彗星試驗作為 DNA 損傷的指標，探討孕婦吸煙及二手煙暴露
 - (a) 與四種代謝基因間有無交互作用；
 - (b) 是否會造成 DNA 損傷。

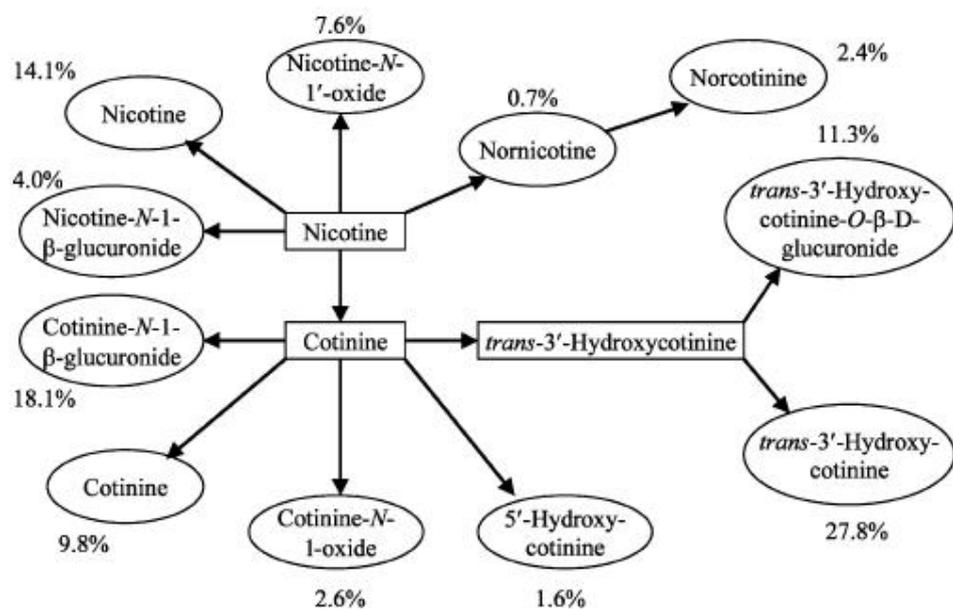
第二章、文獻探討

一、香菸的成分及其作用

香菸所產生的煙霧有主流煙和側流煙二種。所謂「主流煙」就是抽菸者吸入肺部的煙，而「側流煙」則是從點燃的香菸中冒出來的煙，也就是一般說稱為的二手煙(Environmental Tobacco Smoke ETS)。而香菸所產生的煙霧含有四千種化學物質，數十種刺激物質以及四十種以上致癌物質，其中具代表性的有害物質有尼古丁(nicotine)、一氧化碳、刺激物及致癌物。

1. 尼古丁：尼古丁在主流煙大約每支香煙約一毫克，其特性不只是毒性強，它從粘膜的吸收也快。從肺吸收的尼古丁進入人體之後會對末梢神經起作用，使全身的微血管收縮，於是手腳的血液循環不良，體溫降低，運送至皮膚細胞的氧氣和營養量減少。吸菸者在運動時容易出現氣喘、心跳加快或出冷汗等現象，原因是香菸中的尼古丁會使人體的血管收縮，血管收縮，心臟就必須送出更多的血液，心跳也增加至少二、三十次。長期吸煙會造成對尼古丁的成癮性，而且戒菸時會受戒斷癥候群(withdraw syndrome)的痛苦，包括緊張、頭痛、易怒、失眠等⁽³⁾。尼古丁的半衰期較短（大約 30 分

鐘到兩小時)，而被吸入體內的尼古丁大部分在肝臟內廣泛且迅速地
 地被代謝為可丁寧(cotinine)，最後主要轉變為氧化尼古丁(trans-3'-
 hydroxycotinine) ^(1,2)。可丁寧是吸入尼古丁主要代謝物，半衰期
 則為 15–20 小時 ⁽⁸⁾，較可作為長期二手菸之生物指標 ⁽¹²⁾。



圖一 尼古丁的代謝機轉 ⁽²⁾

2. 一氧化碳：一氧化碳在香菸煙霧中的濃度約 400ppm。經常抽菸的人，由於體內一氧化碳濃度較高，會提高一氧化碳與血紅素結合的濃度，使心臟無法輸送足夠氧氣到各器官造成組織缺氧，致使心臟負荷更大，因此而影響到氧氣的運送。也就是說，吸菸人會經常處

於缺氧狀態，由於腦部缺氧，記憶力和學習力也跟著降低，而且也會提高罹患心血管疾病的危險性⁽³⁾。

3. 刺激物：香菸燃燒所產生態刺激物：有氰氫酸(hydrocyanicacid)、丙烯醛(acrolein)、氨(ammonia)、甲醛(formaldehyde)、乙醛(acetal-dehyde)等。這些刺激物質不但會對眼睛、鼻子、咽喉產生刺激，吸入體內後更會抑制呼吸道纖毛清除異物的作用，並抑制肺內白血球與與吞噬細胞的作用，刺激支氣管黏膜下腺體的分泌，導致反覆性急性支氣管發炎及慢性支氣管炎⁽³⁾。
4. 致癌物：菸草燃燒所產生的化合物，不論是蒸氣相(gaseous phases)或是微粒相(particles phases)均含有很多的化合物，並含有許多致癌物⁽¹⁰⁾，最主要致癌物是以多環狀芳香族碳氫化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons ; PAHs) 芳香胺(arylmines)及 Nitroamines 中的甲基硝基胺-3 吡啶-丁酮(4-(methylnitrosamino) -1-(3-pyridyl)-1-butanon, NNK)⁽¹¹⁾。由於多環狀芳香族碳氫化合物的致癌器官是肺部，沈積於肺部的 PAHs 最後亦會進入血液中。而肺癌也是香菸致癌物所主要導致的癌症，此外抽菸也是口腔、咽喉、咽頭、食道、腎臟、膀胱、胰臟、子宮頸等癌的主要原因⁽³⁾。

二、吸煙的盛行率

根據 WHO 的資料顯示，目前全球大約有 20% 的吸煙人口(約 12.5 億)，其中男性大約有 16% (10 億)，女性約 4% (2.5 億)。在吸煙的男性當中，已開發國家約佔 35%，開發中國家佔 50%。其中已開發中國家的中國大陸與印尼的男性吸菸比例為最高(中國大陸 66.9%，印尼 50.0%)。而在已開發國家當中男性吸菸人口的比例，美國是 25.7%，英國 27.0%，日本 52.8% (Tobacco Atlas, World Health Organization, 2002)。

在吸煙的女性方面，已開發國家佔 22%，開發中國家佔 9%。在已開發國家中，如澳洲 (18%)、加拿大 (23%)、英國 (26%)、美國 (21.5%) 等，其女性吸煙所佔的百分比已有下降的趨勢，但是這種趨勢並未在開發中國家出現，而在南歐、中歐、西歐國家 (如德國 31.0%、法國 30.3%、南斯拉夫 42.0%) 的女性吸煙趨勢反而出現上升的情況 (Tobacco Atlas, World Health Organization, 2002)。

根據資料顯示，在 1990 年有 18%、1997 年有 13% 的美國婦女在懷孕期間仍然持續吸菸，而根據家庭調查資料發現，美國女性在懷孕期間吸煙的比率是 22%。另外，在年齡層 15 - 19 歲懷孕的女性吸煙的情況佔了相當高的比例 (18%)。從 1990 年到 1996 年，女性在懷孕期間吸煙的比例有下降的趨勢，但根據 1990 年的統計調查結果顯示，有 23% 的吸煙女性在懷孕期間戒煙，其情況並不持久，有 75% 在懷孕期間戒菸的女性

於生產結束後 6 個月又繼續吸菸⁽¹⁹⁾

大部分的吸煙者在未成年時就開始接觸香菸，而這些吸煙的青少年其中有四分之一的人是在 10 歲之前就開始吸煙的。目前各國年輕族群吸煙的情況，在美國男性(13-15 歲)吸煙人口約佔 27.5%，女性佔 24.2%，而在南美的智利和東歐的烏克蘭是比例較高的地區，都佔了 30%或更高。另外在亞洲方面，除了在西太平洋的一些島嶼比例較高之外(如 Palau: 男性 55.0%，女性 62.0%)，其他國家都在 20%以下 (Tobacco Atlas, World Health Organization,2002)。

而在台灣的吸煙盛行率方面，根據台灣菸酒公賣局於 1996 年所公佈的煙酒消費調查資料⁽¹³⁾中發現，18 歲以上之人口中，吸煙盛行率為 29.71%，吸煙群以男性為主，佔吸菸人口之 94.59%，女性僅佔 5.41%；在男女兩性人口中，吸煙盛行率男性為 55.11%，女性為 3.28%。根據行政院衛生署國民健康局九十一年「台灣地區國民健康促進知識、態度與行為」調查⁽¹⁴⁾顯示，十五歲以上國人吸煙盛行率，男性中有 43.5%的人幾乎每天吸煙，女性中每天吸菸的比率僅 4.2%。而在十二歲以上的民眾中，有抽菸而且每天抽菸的人佔受訪者的 21.1%，其中，以青年組和壯年組者最多，均佔達四分之一，未受正式教育者及大專以上者比較不抽菸，而小學、初中及高中(職)均有近四分之一為每天的抽菸者，男性每天抽菸者之比例遠高於女性，分別是 39.2%對 3.3%。在二手菸部分，女性的同住人

有吸菸習慣百分比為 50.6%，比男性 32.8% 高；在家中會吸到二手菸的百分比，女性為 51.5%，男性為 43.1%⁽¹⁴⁾。

三、吸煙的危害

根據世界衛生組織 WHO 的調查資料，統計在已開發國家和開發中國家過去到現在因吸煙而導致死亡的人數，在已開發國家中，1950 年有 30 萬人、1975 年有 130 萬人、2000 年有 210 萬人因吸煙死亡；在開發中國家，1950 年極少數、1975 年 20 萬人、2000 年 210 萬人因吸煙死亡，顯示吸煙對健康造成的傷害日益嚴重。另外此項調查資料亦預測在 2030 年時，已開發國家有 300 萬、開發中國家會有 700 萬的人口會死於煙害 (Tobacco Atlas, World Health Organization, 2002)。

而吸煙對於人體造成的傷害主要可歸為下列幾點：癌症^(4,6)、呼吸系統疾病、心臟血管疾病⁽⁶⁾、消化性潰瘍、藥物代謝作用障礙。另外亦有研究指出吸煙會影響人體的免疫系統⁽¹⁶⁾。

目前全世界均認為吸煙是引起肺癌的最主要原因。世界衛生組織 2003 年指出，在歐盟的十五個成員國中，在 1998 年，估計患肺癌死亡的個案中，約有 82% 為抽煙所引致⁽¹⁵⁾；根據衛生署公佈的資料，國人的肺癌死亡率還是逐年的增加，並且曾經在 2000 年超過肝癌而成為癌症 10 大死因的第一位。⁽²⁰⁾

環境中的二手煙（ Environmental Tobacco Smoke ）也是人類的致癌物。在二手煙對於人體危害的研究中，較大的困難是在暴露量無法精確的測量，所以發展適當的生物指標相當重要。一般以測量血中或尿中的可丁寧（ cotinine ）含量作為暴露總量的替代指標^{（12, 22）}。

長期持續的吸煙者得到肺癌的相對危險性（ relative risk ）是不吸煙者的 23~30 倍。暴露於二手煙環境者，其得到肺癌的相對危險性是沒有暴露於二手煙環境且不吸煙者的 1.5 倍。根據美國過去的一個大型研究發現，在家中受到二手煙暴露者會增加 20% 死於心血管疾病的危險性，此資料並顯示，男性暴露於二手煙比沒有暴露者死於心血管疾病的危險性高出 1.22 倍，女性為 1.10 倍^{（21）}。

二手煙會使罹患心血管疾病或是肺癌的危險性上升 25%。在美國過去與心血管疾病及肺癌相關的研究指出，暴露二手煙者（與吸煙者同住或結婚）其心血管疾病的危險性上升 23%，肺癌的危險性上升 26%^{（18）}。根據 WHO 調查，在美國罹患癌症者有 3000 人與暴露二手煙有關，罹患心血管疾病中有 35000 - 62000 人暴露二手煙有關（Tobacco Atlas, World Health Organization, 2002）。

而婦女方面，在成熟女性的粗死亡率中，有 21% 是死於因吸煙導致的心血管疾病^{（17）}。婦女抽煙跟男性一樣會增加致癌、心臟血管疾病、肺

部疾病的機會，也會造成月經及生殖機能的問題。^(6, 19)。觀察吸煙婦女可發現，吸煙可使輸卵管內纖毛運動改變，進而影響受精卵的著床；子宮內膜血管末梢收縮，使得微循環較差，降低了受孕的機會；況且，吸煙還會使體內的自由基增加，促使卵子老化，造成受孕的困難。

此外吸煙亦會造成婦女相關癌症發生的危險性，有研究顯示吸煙為導致子宮頸癌的重要環境危害因子之一，台灣地區婦女的吸煙率僅 3 至 4 %，相較於歐美白種女性之吸煙率為低（約 28%），因此吸煙對於台灣婦女罹患子宮頸癌的直接影響應屬有限。但在流行病學研究上已發現除了抽煙之外，二手煙的暴露與子宮頸癌亦具有相關性，研究中發現暴露於二手煙者罹患子宮頸癌的機率為無暴露者的 2.73 倍，另外二手煙暴露量超過 20 包/年的樣本其罹患子宮頸癌的機率為 2.99 倍⁽²⁴⁾。

若婦女在懷孕期間吸煙或暴露二手煙，會對胎兒造成多方面嚴重的影響。胎兒靠著胎盤與臍帶由母親提供營養和氧氣。所以母親所攝取的任何物質都有可能透過胎盤而傳入胎兒體內，胎兒毫無選擇權利，必須照單全收⁽³⁾。

目前已有相當多的研究證實孕婦吸煙將危害胎兒，長庚醫院婦產部研究報告顯示，每天抽一包煙的孕婦比不抽煙的孕婦增加 20% 的周產期併發症和死亡率；每天抽多於一包者則增加 30% 的危險性。而尼古丁會

使孕婦的小動脈緊縮，造成胎盤的局部缺血，導致胎盤病變^(3, 30)。另外，早產、懷孕期間出血、早期破水、前置胎盤、胎盤早期剝離的機會均增加，並造成新生兒身高、體重、頭圍、胸圍較少，而且新生兒死亡率也增加百分之二十至百分之三十^(3, 23, 26, 28, 30)。胎兒的呼吸功能降低和發生氣喘的機率也和母親在懷孕期間是否有吸煙或暴露二手煙有關^(28, 29)。另外也有研究顯示婦女在懷孕期間吸煙，會產生意志消沉或沮喪的情況⁽²⁵⁾。

如果排除母親在懷孕期間吸煙的因素，可降低 10% 的嬰兒死亡率，女性如果在懷孕前或懷孕時實行戒煙的動作，可降低一些有害的情況，包括不易懷孕（difficulties in becoming pregnant），早產兒（preterm delivery），呼吸功能降低，氣喘和低出生體重^(15, 29)。

香煙中所含的有害物質(如 polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)亦會對人體的DNA造成損傷（DNA damage）。由於PAHs進入人體藉由代謝作用之後會產生更具毒性的代謝產物，此類產物會與人體的DNA以共價鍵的方式接合，產生突變，而這類的DNA 損傷如果無法修復的話，便會產生細胞異常增殖，造成腫瘤或癌症發生⁽³¹⁾。另外有研究指出老鼠暴露在香煙的側流煙（side-stream smoke），會對其肺臟、心臟及肝臟等部位的組織造成DNA的損傷，而這種類型的損傷已在病因學上被證實與人體的慢性疾病產生有關⁽³²⁾。

四、代謝基因與其基因多型性

環境與基因交互作用的結果，與人體對有害物質的感受性具有高度的相關。環境中許多毒性物質進入人體之後並不會直接造成癌症，這些毒物經過人體的代謝之後，大部分會被排出體外，只有少部分經代謝活化後形成致癌物質⁽³⁹⁾。許多有害的化學物質或代謝產物對 DNA 損傷逐漸累積時，會使細胞產生異常，導致癌症生成，故代謝與解毒能力為體內第一道防線^(33, 38, 39)。對於外來有害物質，在易感受體 (susceptibility) 的體內會先經過第一期酵素 (phase I enzymes) 以及第二期酵素 (phase II enzymes) 的生物轉化 (biotransformation) 使產生代謝過程與解毒作用。第一期酵素是將致癌物或致突變物活化成 epoxides 或活化氧 (reactive oxygen) 的形式，而使致癌物或致突變物更容易與 DNA 結合形成鍵結物，例如細胞色素 P450 (cytochrome P450) 系列基因。第二期酵素則是將致癌物或致突變物，代謝成較不具親電性或較具水溶性之代謝產物，以加速有毒化合物之代謝，如穀胺基硫轉移酵素 (glutathione S-transferase, GST)、N-乙醯基轉移酵素 (N-acetyltransferases; NAT)。當使毒物活性上升的第一期酵素活性受抑制，或代謝毒物的第二期酵素功能完整時，應可保護細胞不受毒物影響。相對的，如果第二期酵素有突變或缺失時，則無法正常代謝毒物，使得致癌或罹患其他疾病的危險性增加^(33, 38, 39)。

許多環境毒物與致癌物質在進入體內經由第一期酵素代謝活化，導

致攻擊 DNA 的能力增加，成為潛在致癌因子，最主要的活化酵素為細胞色素 cytochrome P450 (CYP)。細胞色素 P450 系統，是一群具單氧? (monooxygenase) 活性之酵素的總稱，可在小腸、肺臟、腎臟、皮膚，特別是肝臟的細胞內發現此類酵素的的存在。在細胞色素 P450 中專職異種物質 (xenobiotic ，如環境致癌物質、藥物等) 之氧化代謝者，主要包括三個基因家族：CYP1、 CYP2 及 CYP3；而 CYP1 基因家族中的 CYP1A1 及 CYP1A2 主要參與香菸致癌物質 PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons ，多環芳香烴化合物) 的代謝⁽⁴⁰⁾。

CYP1A1 基因主要位於染色體 15q22-q24 的位置上⁽⁴²⁾，屬於 Phase I 之代謝活化酵素，可代謝 PAHs 產生嗜電性中間產物如 benzo(a)pyrene (BaP) 與 7,12-dimethylbenz(a)anthracen，而這些中間產物會攻擊細胞 DNA，產生 DNA 鍵結物，造成 DNA 損傷，此時若體內的 DNA 修補作用無法即時修復已受損的 DNA，則會造成突變，產生致癌性。已有研究指出 CYP1A1 的基因型多型性與體內產生 DNA adduct 形成的嚴重程度有關^(39, 43, 43)

CYP1A1 的酵素活性可能與基因多型性有關，CYP1A1 共有三個具有基因多型性的位置：第一個位置主要在 3 端 noncoding region 發生 T? C transition，形成 Msp I 限制? 切點，且以 Msp I 限制? 進行限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析時，可測得

三種基因型多型性：野生型的同質合子（wild-type, 兩條對偶基因均不含 Msp I 限制? 切割點）、變異型（variant）的同質合子（變異/變異型, 兩個對偶基因都含有 Msp I 限制? 切割點）以及只有單一個變異型的異質合子（野生/變異型）；第二個及第三個位置則主要在 exon 7 發生 codon462 位置原本的胺基酸 isoleucine 被 valine 取代^(40,44)。目前有研究顯示當 CYP1A1 至少有一個 allele 出現變異時，搭配其他情況（如：與其他基因型合併影響、吸煙或暴露二手煙 ETS），會增加 DNA adduct 的嚴重程度，顯示基因 - 環境與基因 - 基因的交互作用都會影響基因毒性對人體的傷害⁽³⁹⁾。Marc 等人的研究發現女性的 CYP1A1 的同型合子變異型比野生型對於子宮頸鱗狀上皮損傷（cervical squamous intraepithelial lesions）的危險性高出 3.4 倍⁽⁴⁶⁾。Janice 等人的研究指出 CYP1A1 的同型合子變異型比野生型出現較高的染色體異常率⁽⁴⁵⁾。而基因型在人種分佈方面，研究指出高加索人（Caucasians）變異/變異型佔 79%，變異/野生型佔 19%，野生/野生型佔 2%；亞洲人（Asian）的分佈各為 48%、39%、13%；非裔美國人（African-Americans）分佈各為 43%、38%、3%；非洲人（Africans）佔 36%、39%、3%⁽³⁵⁾。

穀胺基硫轉移酵素（glutathione S-Transferase, GST）是人體負責代謝異物的第二階段酵素，其主要功能是將 glutathione 接上異物，以增加親水性而排出體外，而接合作用（conjugation）是 Glutathione S-transferase

所催化的典型反應，主要將異種物質與 glutathion(GSH)的-SH group 進行結合以提高這些物質的極性，最後能溶於尿液而被排出人體外，而異種物質包含了許多的環境致癌物、毒物如：Benzopyrene；殺蟲劑如 DDT；藥物如 cisplatin 或 acetaminophen (NAPQI) 等，若這些有害物質在體內持續累積無法代謝，則會對 DNA 或蛋白質進行攻擊，產生 DNA 鏈結物或使 DNA 突變受損，導致 DNA 發生單股或雙股斷裂(strand break)^(46, 47, 33, 48)。而 GST 依其蛋白結構可分為四種不同的同功酵素— $\alpha, \mu, \rho, \theta$ ，本研究中所要探討的是 GSTM1 (μ) 與 GSTT1 (θ) 兩個基因型。

GSTM1 位於染色體 1p13 上面，其基因多型性主要是由於整個基因座缺失而使其失去活性，因此分成非無效型 (wildtype) 及無效型 (null type) 兩種⁽³³⁾。GSTM1 無效型組合的頻率，白人約 40-55%⁽⁴⁹⁾，黑人族群約 30%左右。台灣族群的研究則發現無效型基因型的比例為 45-63%左右^(50, 51)。本實驗室先前之研究顯示乳癌病患中無效型佔 56.7%，對照組佔 41.7%⁽¹⁰⁶⁾。GSTT1 位在染色體 22q11.2⁽⁵⁵⁾，與 GSTM1 相同，亦因整段基因缺失與否而分為非無效型與無效型。白種人無效型比為 10%至 20%⁽⁵³⁾，在中國大陸無效型分佈比為 45.4%⁽⁵⁴⁾，本實驗室先前之研究顯示乳癌病患中無效型佔 45.0%，對照組佔 43.3%⁽¹⁰⁶⁾。

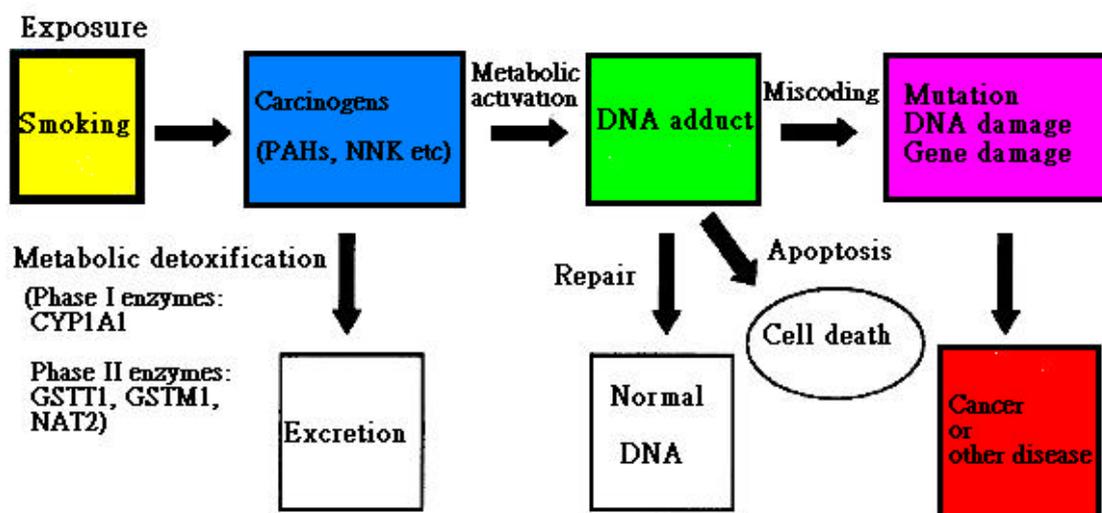
許多研究都證實 GSTM1 與 GSTT1 基因型對各種癌症或疾病形成之易感性有關：有研究顯示在肺癌患者中 GSTM1 無效型出現的頻率較高，

如患者為重度吸煙者且 GSTM1 為無效型基因型時，罹患肺癌的危險性增加了 2-6 倍，但在 GSTT1 和 GSTP1 並無顯著相關^(52,57)；Sirku 等人的研究發現以單一基因型去探討肺癌危險性時並無顯著相關，但結合 GSTT1 和 GSTM1 皆為無效型時則發現會使罹患肺癌的危險性上升兩倍⁽⁵⁶⁾；若與第一期代謝基因合併，則發現同時帶有 CYP1A1 同質變異型和 GSTM1 無效型時會出現較高比例的 DNA adduct, 如加上環境二手菸(ETS) 暴露的情況下，則 DNA adduct 的等級會出現更嚴重的趨勢⁽³⁹⁾，另有研究顯示當易感性個體同時具有 CYP1A1 同質變異型和 GSTM1 非無效型時，對於因吸菸造成的肺癌有抵抗的效果^(38,36)；日本一病例對照研究顯示，由於吸菸而罹患癌症的患者與對照組中，基因型同時為 CYP1A1 同質變異型與 GSTM1 無效型者在 case 組有較高比例（81.3%），control 組 39.4%(P < 0.01)⁽⁶¹⁾。其他疾病方面，研究發現在法國囊胞性纖維症(cystic fibrosis)患者多屬於 GSTM1 無效型⁽⁵⁸⁾；在多原發性腫瘤(multiple primary neoplasms , MPN) 患者中，GSTT1 與 GSTM1 無效型的比例高於單一原發性腫瘤(single primary neoplasms , SPN) 患者（前者 60% ，後者 33% ）⁽⁵⁹⁾；其他如膀胱癌、心血管疾病、子宮頸？狀上皮損傷、口腔癌等疾病的危險性，亦與 GSTT1、GSTM1 無效型或合併 CYP1A1 等基因型影響有關^(33, 46, 47, 60)。

N-乙醯基轉移酵素(N-acetyltransferases , NAT)與巯胺基硫轉移酵素

GST 均為第二期代謝酵素。NAT 具有兩個同功酵素，分別為 NAT1 和 NAT2，本研究主要探討的為 NAT2。NAT2 位於染色體 8p22 上⁽⁶¹⁾，可區分為快型和慢型，而快型和慢型可由對偶基因（allele）變異的不同各分為四種和六種基因多型性。快型分為：野生型（wild type）的 NAT2*4/NAT2*4、只有一個對偶基因變異的 NAT2*4/NAT2*5、NAT2*4/NAT2*6、NAT2*4/NAT2*7；而慢型則是兩個對偶基因均有變異，分別為：NAT2*5/NAT2*5、NAT2*5/NAT2*6、NAT2*5/NAT2*7、NAT2*6/NAT2*6、NAT2*6/NAT2*7、NAT2*7/NAT2*7⁽⁶¹⁾。N-乙醯基轉移酵素與代謝環境毒物和致癌物有關，當人體暴露於 aromatic amine 時，可經由 NAT 代謝進行解毒作用⁽⁶²⁾；NAT 亦可代謝香菸中產生的 arylamines 與雜環胺（heterocyclic amines），進行乙醯化作用（N-acetylation）代謝解毒作用^(63, 64)，且亦會亦進行氧基乙醯化（O-acetylation），產生嗜電性中間產物攻擊 DNA⁽⁶⁵⁾。NAT2 快慢型分佈方面，英國高加索人快型約佔 33.9%，慢型約 66.1%，南非黑人快型佔 60.4%，慢型 39.6%⁽⁶⁶⁾，新加坡中國婦女快型佔 74.5%，慢型佔 25.5%⁽⁶⁷⁾。過去有許多研究顯示 NAT2 與吸煙造成的疾病有相關性，在 Hou 等人的研究當中指出研究對象為 NAT2 慢型時，肺癌的危險性會隨著吸菸嚴重度上升而增加⁽⁶⁸⁾；若女性為吸菸 20 年以上且合併 NAT2 慢型者，會使乳癌的危險性增加 2.29 倍⁽⁶⁹⁾，而在非吸煙者的女性當中，NAT2 慢型可能扮演著增加肺癌危險性的角色

(⁶⁷)；此外，當易感個體同時為 GSTM1 無效型與 NAT2 慢型時，會增加肺癌與乳癌的危險性 (^{68,69})。而吸菸者為 NAT2 慢型或合併 GSTM1 無效型時亦會增加 DNA adduct 的嚴重度 (^{70,71})。NAT2 快型與增加結腸直腸癌危險性有相關 (^{72,73})，慢型與增加膀胱癌危險性有關 (^{63,74,75,76})，若加上有吸煙習慣則會更增加罹病危險性 (⁷⁵)。其他如肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma)、口腔? 狀細胞癌 (OSCC)、染色體異常 (CA)、子宮內膜異位、遺傳性過敏等疾病亦與 NAT2 基因多型性或合併其他基因型(如 GSTM1)有關 (^{62,64,77,61,78})。



圖二 外來毒物能經由代謝基因之解毒作用排出體外，若基因功能不全而無法進行代謝作用，則可能會造成疾病產生。

五、彗星試驗(Comet Assay)或單細胞凝膠電泳法(Single Cell Gel Assay ; SCGE)

彗星試驗是一項新發展的實驗技術，能夠快速容易測量個體細胞 DNA 損傷的程度。這項技術是由 Ostling 和 Johanson 於 1984 年所開發出，其試驗分析的機制，是當 DNA 股受到損傷而產生斷裂時，會將斷裂的片段釋放出來，之後藉由電泳的方式將斷裂的片段延長出來，以特殊的染劑 PI (Propidium iodide) 染色，再利用螢光顯微鏡觀察。而延長的 DNA 片段在顯微鏡下觀察時會呈現彗星一般的拖尾情況，便可由此拖尾的程度來判斷 DNA 受損的程度^(79,80)。而隨著技術的進步，彗星試驗可同時檢測大量的樣本，且不會影響實驗的敏感度⁽⁸¹⁾。

香菸的成分會對 DNA 產生傷害（例如：DNA adduct, 單股斷裂, 鹼基位置改變等）。Chang 等人的研究中，以工廠工人與管理部門的員工做比較，發現吸煙者以及暴露於菸草煙塵的工人其拖尾情況較為嚴重⁽⁸²⁾；Poli 等人的研究顯示吸煙會使 DNA 損傷增加，並加重彗星試驗拖尾的情況，且某些藥物亦會對 DNA 造成損傷⁽⁸³⁾；Tai 等人以彗星試驗調查在電梯製造廠員工暴露有害因子的情況（如吸煙，二手煙，飲酒等），發現吸煙會增加彗星拖尾的長度，且拖尾等級與每日香菸消耗量有顯著相關⁽⁸⁴⁾。將懷孕老鼠暴露香菸煙霧的試驗，也發現母鼠和幼鼠 DNA 斷裂的情況均顯著，且母鼠 DNA 斷裂的情況較幼鼠嚴重⁽⁸⁵⁾。另外亦有其他研

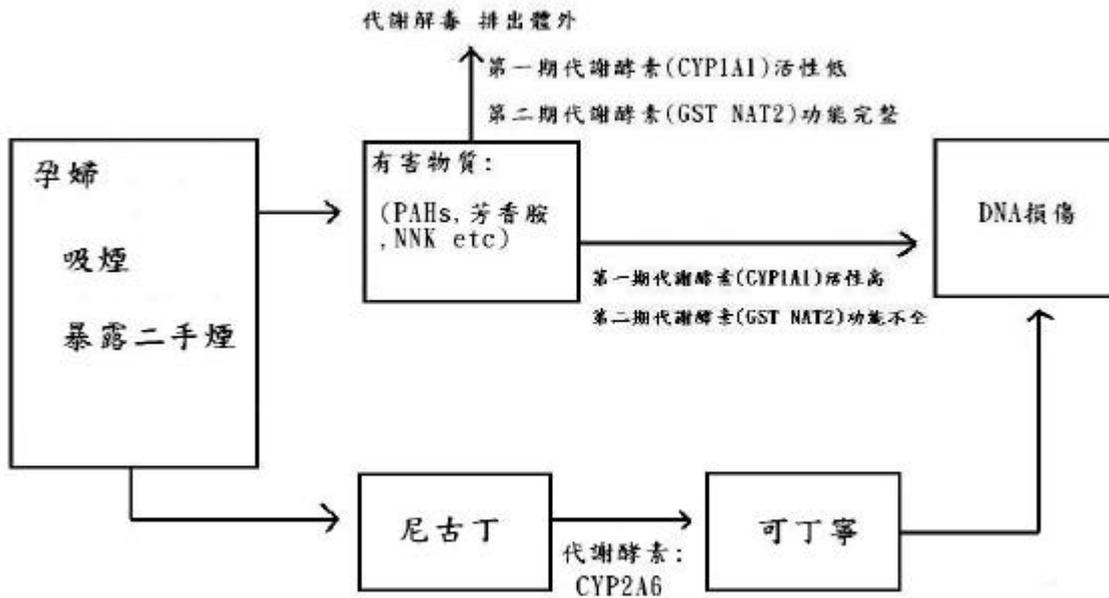
究顯示吸煙會造成 DNA 不同程度的損傷⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾。

而彗星試驗亦可用於其他有害物質的研究。Norbert 等人利用人體不同組織的細胞觀察有害物質（如 dibutylphthalate, N'-nitrosodiethylamine, benzo[a]pyrene）對 DNA 損傷的影響，發現均會使細胞 DNA 拖尾情況增加⁽⁸⁹⁾；Danadevi 等人分析工廠中暴露於鉛之工人對 DNA 損傷的影響，發現受暴露工人的 DNA 損傷較對照組嚴重，且具有顯著意義，損傷程度亦會隨著暴露量增加而上升⁽⁹⁰⁾。其他毒物如 HgCl₂、氯乙烯，藥物如抗癌劑、安眠藥、麻醉藥，以及飲食方面（如：喝茶、食用蔬菜於否）等運用彗星分析來觀察對 DNA 損傷的研究，都發現有顯著的影響⁽⁹¹⁻⁹⁶⁾。

第三章、材料與方法

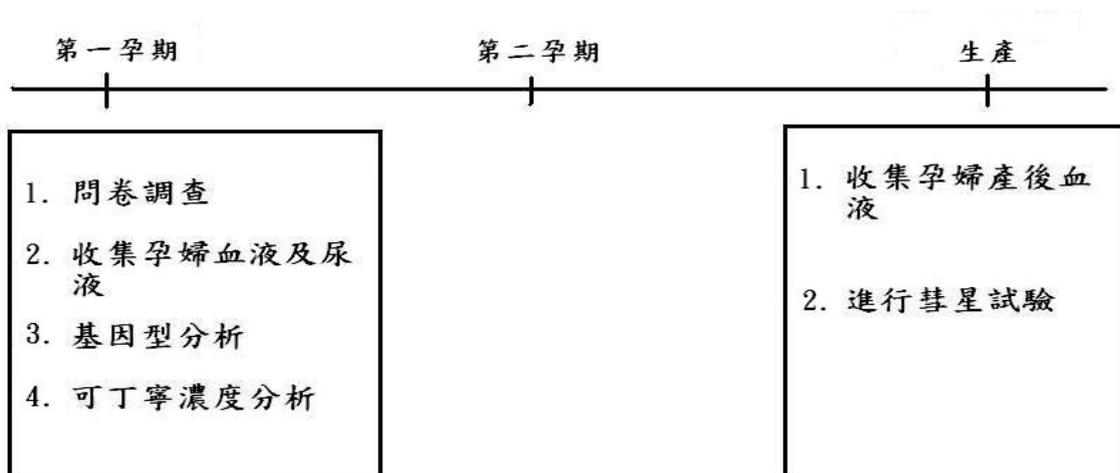
一、研究架構

(?)



註：PAHs:多環狀芳香族碳氫化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons)
 NNK: 甲基硝基胺-3吡啶-丁酮(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon)

()



二、研究對象

本研究對象之孕婦自 2003 年 6 月開始收案至 2004 年 5 月止，以自願者方式徵求共 418 名，並進行問卷調查及基因型分析，依孕婦問卷調查分為吸菸(目前有吸煙或過去有吸煙但現在已戒菸者)、暴露二手菸(在工作場所或家中有人吸煙或有聞到煙味者)及非吸菸者。以 cotinine 濃度分為高、中、低(控制組)三組共 363 名。另外到 2004 年 5 月止共有 148 名孕婦生產並同時進行彗星試驗分析。以上研究對象經過醫師診斷皆無任何呼吸性疾病或新陳代謝異常者。

三、研究方法

1. 問卷調查

個人資料(年齡、教育程度、職業、飲酒習慣等)吸煙史、平均每天抽菸量、頻率吸入量、抽菸時間等。可能二手菸暴露，室內，室外，工作場所暴露情況，時間等。

2. 分析方法.

(1) 尿液取得在一天起床尚未抽菸或曝露二手菸時即收集尿液當作 pre-shift urine。至晚上就寢時收集尿液當作 post-shift urine。

尿液 cotinine 前處理方式及分析方法由本校環醫所郭憲文教授之專任助理進行實驗。

- (2) 每位受測者之血液均放入含 EDTA 抗凝血採血管收集編號之，並儲存於 4 度 C 冰箱內，以抽取 DNA 並進行基因型之分析(共 418 名)。
- (3) 生產時收集孕婦血 5-10 cc，同樣裝入含 EDTA 抗凝血採血管保存於 4 度 C 冰箱，並在 24 小時之內完成彗星試驗 (comet assay) 之步驟 (共 148 名)。

3. DNA 萃取

將先前離心好的白血球取出後，加入三倍白血球體積之 1X RBC lysis buffer，搖晃均勻後置於冰上 15 分鐘。離心 1200rpm 15 分鐘，去除上清液後重複上述動作一次，之後加入 1ml 的 GenoMarker reagent。在室溫下靜置 5 分鐘。之後加入 0.5ml chloroform 上下搖晃均勻，離心 12,000rpm，4 5 分鐘。取出上清液放入新的 1.5 微量離心管中，加入 0.5 ml isopropanol，上下搖動直到出現白色 DNA 絲。在 4 度 C 下離心 12,000rpm，10 分鐘，小心去除上清液，加入 0.3ml 70% ethanol，離心 12,000rpm，10 分鐘，去除上清液後，此步驟在重複一次。移除上清液後，將管子倒置隔夜晾乾，之後將 DNA 溶於 10% TE buffer 100µl 中隔夜消化後，以 1% agarose gel 進行前測。完成後置於 -20 度 C 冰箱中保存。

4. 基因型檢定

以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction , PCR) -限制片段長度多型性 (restriction fragment polymorphisms , RFLP) 方法 , 對 CYP1A1、GSTT1、 GSTM1 及 NAT2 基因型進行鑑定。

I、 CYP1A1- Msp I Polymorphism

(1) Primer 序列

5'- CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT -3'

5'- GAGGCAGGTGGATCACTTGAGCTC -3'

(2) PCR 反應溶液之配置

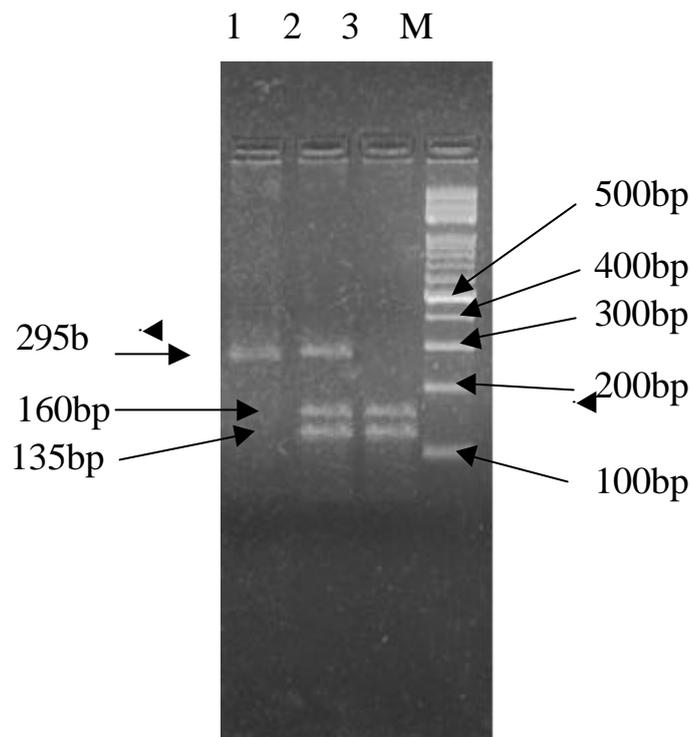
- a. DNA 2 μ l
- b. CYP1A1 primer 各 1 μ l
- c. 去氧核甘三磷酸 (dNTP) 4 μ l
- d. Pro Taq Buffer 5 μ l
- e. Taq 聚合酶 (Taq polymerase) 0.5 μ l
- f. 最終體積以蒸餾水調製成 50 μ l

(3) PCR 反應步驟

95 $^{\circ}$ C、5 分鐘作為預變性(Pre-denature), 其次以 94 $^{\circ}$ C、40 秒; 66 $^{\circ}$ C、25 秒; 72 $^{\circ}$ C、40 秒的條件循環反應 35 次, 最終設定 72 $^{\circ}$ C、6 分鐘, 使產物反應更完全。之後在 PCR 產物內加入 MspI 限制酶、限制酶反應液及蒸餾水, 共 20 μ l, 並置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽內 3 小時。再以 3% agarose gel

進行電泳分析。

聚合？鏈鎖反應產物為 295bp。CYP1A1 Msp I 型野生型 (wild-type) 兩條對偶基因均不含 Msp I 限制？切割點，故電泳結果只有一個 DNA 片段，其長度為 295bp。若屬於變異型 (variant) 的同質合子 (變異/變異型)，因兩個對偶基因都含有 Msp I 限制？切割點，故可切成兩個較短的 DNA 片段：135 bp 與 160 bp。若同時出現 295bp、160 bp 與 135 bp 的 DNA 片段則為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子 (野生/變異型)。



1: CYP1A1 Msp I 野生/野生型
2: CYP1A1 Msp I 變異/野生型
3: CYP1A1 Msp I 變異/變異型
M: Maker

II、GSTT1、GSTM1 polymorphism

(1) Primer 序列

GSTT1 : 5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC -3'

5'- TCTCCGGATCATGGCCAGCA -3'

GSTM1 : 5'- CTGCCCTACTTGATTGATGGG -3'

5'- CTGGATTGTAGCAGATCATGC -3'

β -globin : 5'- ACACAACCTGTGTTCCTACTAGC -3'

5'- CAACTTCATCCACGTTCACC -3'

(2) PCR 反應溶液之配置

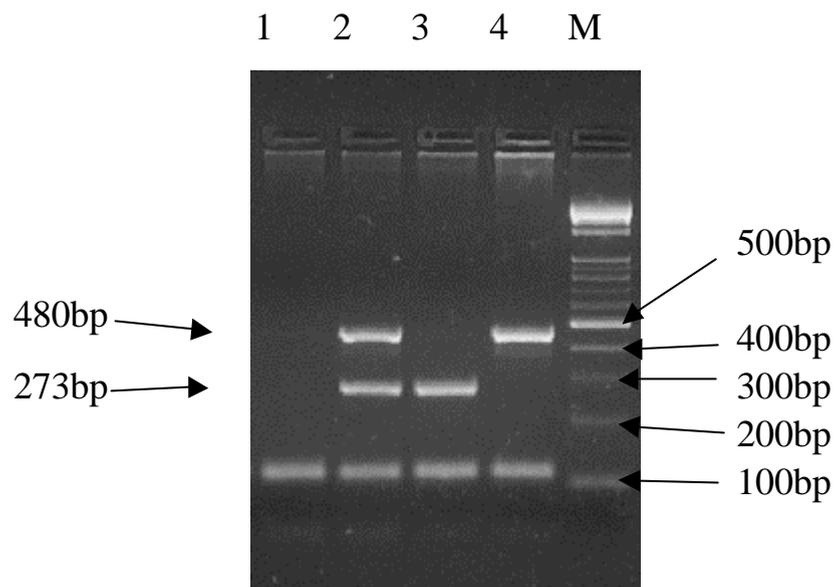
- a. DNA 2 μ l
- b. GSTT1、GSTM1 primer 各 0.8 μ l , β -globin primer 1 μ l
- c. 去氧核甘三磷酸 (dNTP) 10 μ l
- d. Pro Taq Buffer 5 μ l
- e. Taq 聚合? (Taq polymerase) 1.5 μ l
- f. 最終體積以蒸餾水調製成 50 μ l

(3) PCR 反應步驟

95 、 5 分鐘使雙股 DNA 變性 ; 其次以 95 、 40 秒 ; 63 、 40 秒 ; 72 、 40 秒的條件循環反應 35 次 ; 最後設定 72 、 6 分鐘 , 使產物反應更完全 , 以 3 % agarose gel 進行電泳分析。GSTM1 與 GSTT1 可同時進行反應 , 並以 β -globin 作為內標 (internal control) 幫助判斷聚合?

鏈鎖反應是否良好，不論樣本是否帶有完整之 GSTM1 或 GSTT1 基因，均會產生 100bp 的 β -globin 基因片段。

若 GSTM1 及 GSTT1 基因有缺失，則特定序列的引子無法與 DNA 模板 (templet) 產生重旋，若沒有基因缺失，則可經增幅步驟產生 DNA 片段。若樣本 GSTM1 為非無效型，則可得到 273bp DNA 片段的 GSTM1 產物，如果樣本 GSTT1 為非無效型，則可得到 480bp DNA 片段的 GSTT1 產物。



- 1: GSTT1、GSTM1 均為無效型
- 2: GSTT1、GSTM1 均為非無效型
- 3: GSTT1 為無效型，GSTM1 為非無效型
- 4: GSTT1 為非無效型，GSTM1 為無效型
- M: Maker

每個樣本都應產生 β -globin (100bp)

、 NAT2 polymorphism

(1) Primer 序列

5'- TCTAGCATGAATCACTCTGC -3'

5'- GGAACAAATTGGACTTGG -3'

(2) PCR 反應溶液配置

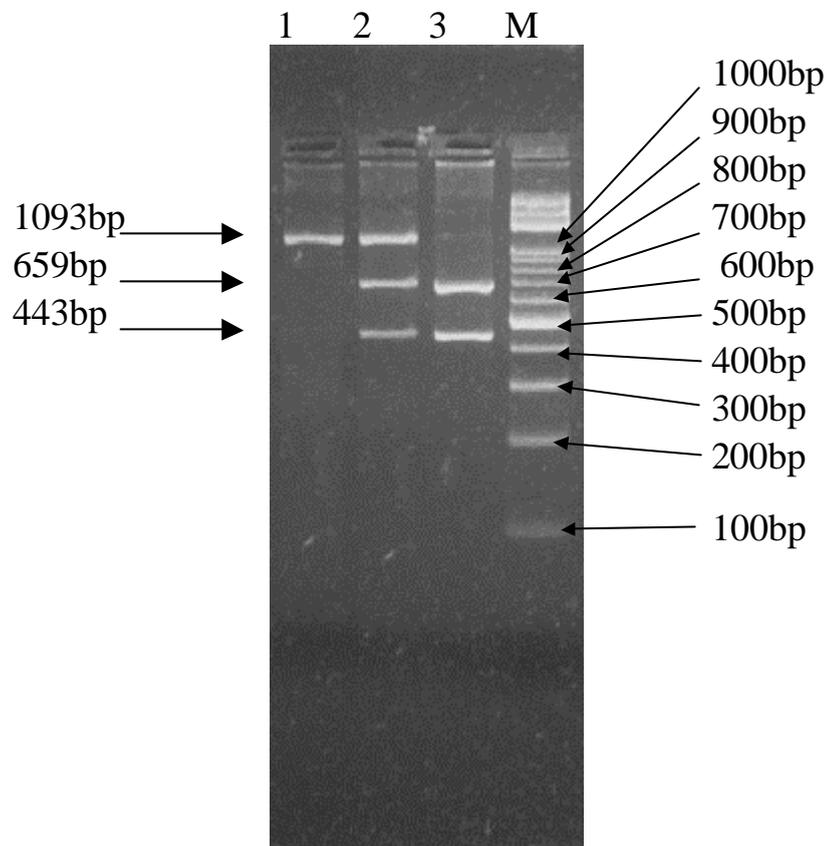
- a. DNA 3 μ l
- b. NAT2 primer 各 1 μ l
- c. 去氧核甘三磷酸 (dNTP) 10 μ l
- d. Pro Taq Buffer 5 μ l
- e. Taq 聚合酶 (Taq polymerase) 1 μ l
- f. 最終體積以蒸餾水調製成 50 μ l

(3) PCR 反應步驟

95 $^{\circ}$ C、4 分鐘作為預變性 (Pre-denature)，其次以 94 $^{\circ}$ C、1 分鐘；52 $^{\circ}$ C、1 分鐘；72 $^{\circ}$ C、1 分鐘的條件循環反應 35 次，最終設定 72 $^{\circ}$ C、6 分鐘，使產物反應更完全。

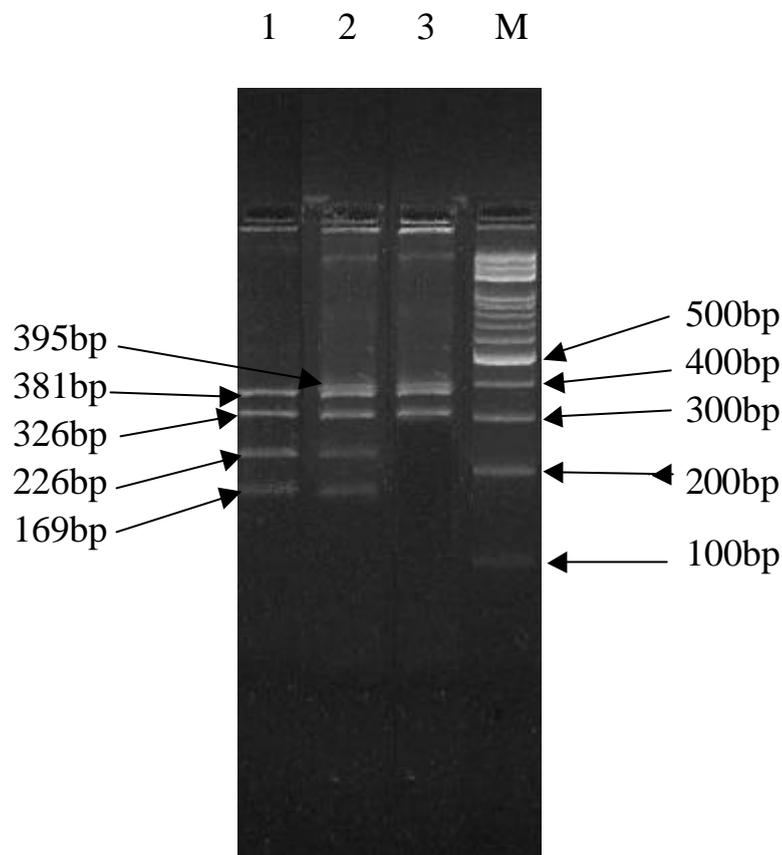
在 PCR 產物內分別加入 Kpn I、Taq I 與 BamHI 限制酶、限制酶反應液及蒸餾水總共 20 μ l。分別以 37 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 置於水浴槽內作用 3 小時，使反應更完全。之後以 3 % agarose gel 進行電泳分析。NAT2 野生型 allele 為 NAT2*4，同質合子之野生型 (wild-type) 兩條對偶基因都可被三種限制酶作用。

Kpn I 型為 NAT2*5 (M1 allele), 在 C481T 產生取代, 若樣本為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子, 則只有一個對偶基因含 Kpn I 限制? 切割點, 因此應同時出現 1093bp、659bp 與 443bp 三個 DNA 片段, 若樣本屬於同質合子之變異型 (variant), 兩個對偶基因均無 Kpn I 限制? 切割點, 故只有一段較長的 1093 bp DNA 片段。



- 1: NAT2 Kpn I 變異/變異型 (NAT2*4 / NAT2*4)
- 2: NAT2 Kpn I 野生/變異型 (NAT2*4 / NAT2*5)
- 3: NAT2 Kpn I 野生/野生型 (NAT2*5 / NAT2*5)
- M: Maker

Taq I型為 NAT2*6 (M2 allele), 在 G590A 產生取代, 若樣本為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子, 會同時出現 395bp、381bp、326bp、226bp 與 169bp 五個 DNA 片段, 若樣本屬於變異型 (variant) 的同質合子, 則會出現 395bp、381bp 與 326bp 三個 DNA 片段。



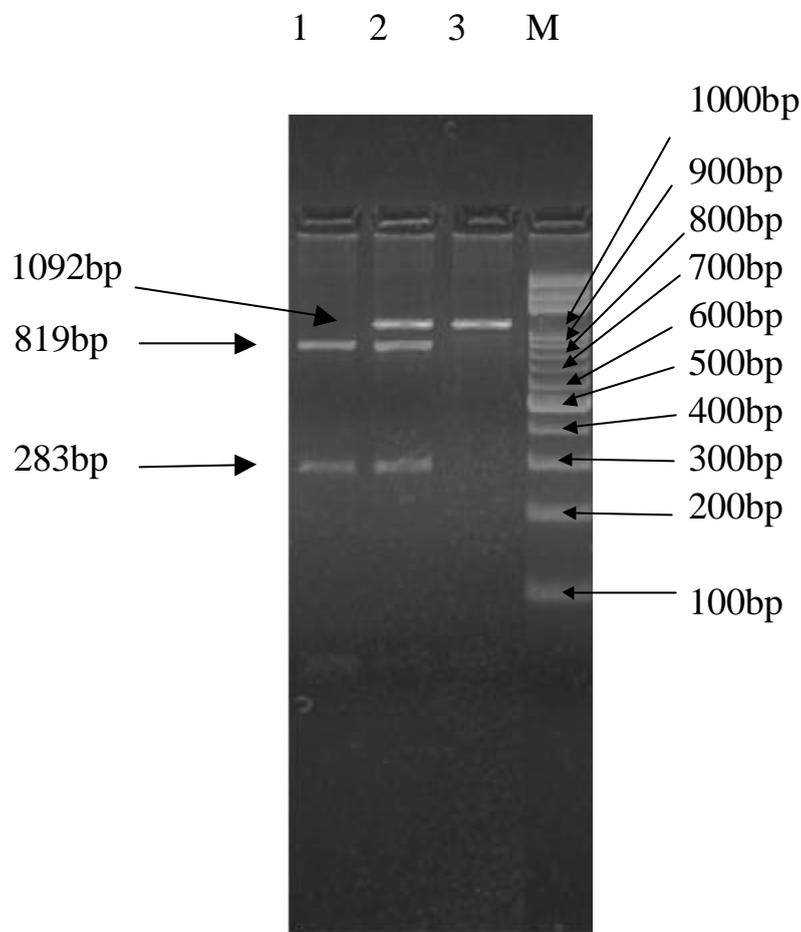
1: NAT2 Taq I 野生/野生型 (NAT2*4 / NAT2*4)

2: NAT2 Taq I 野生/變異型 (NAT2*4 / NAT2*6)

3: NAT2 Taq I 變異/變異型 (NAT2*6 / NAT2*6)

M: Maker

BamHI 型為 NAT2*7 (M3 allele) , 在 G857A 產生取代 , 若樣本為帶有一個變異型(variant)的異質合子 , 則只有一個對偶基因有 BamHI 限制? 切割點 , 因此應同時出現 1092bp、819bp 與 283bp 三個 DNA 片段 , 若樣本屬於變異型 (variant) 的同質合子因兩個對偶基因無 BamHI 限制? 切割點 , 只有一段較長的 1092bp DNA 片段。



- 1: NAT2 BamHI 野生/野生型 (NAT2*4 / NAT2*4)
- 2: NAT2 BamHI 野生/變異型 (NAT2*4 / NAT2*7)
- 3: NAT2 BamHI 變異/變異型 (NAT2*7 / NAT2*7)
- M:Maker

5. 彗星試驗 (Comet assay)或單細胞凝膠電泳法 (Single Cell Gel Assay)

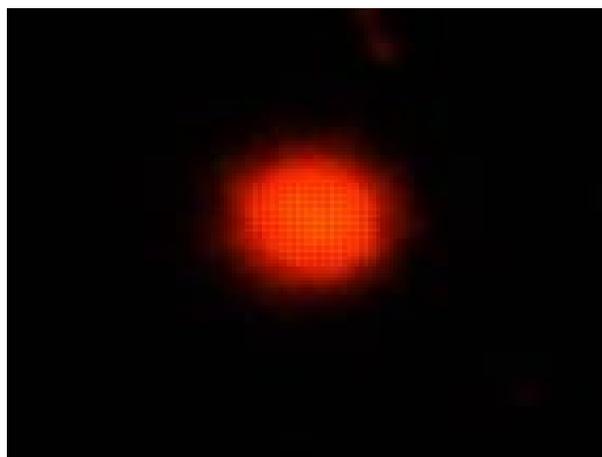
先取 85 μ l 1% NMA 於 slide 上，蓋玻片蓋上於室溫下固化（40分鐘至一小時）【第一層膠】。取 4ml 產婦血液，加入離心管與 4ml PBS 混合均勻，將混合液“緩慢”注入 Histopaque 分離液之分離管中，讓混和液分布在分離液上方。【注意：(1) 混合液：Histopaque = 2：1。(2) 滴入混合液時要沿著管壁緩慢的滴入，勿將混合液與分離液混合，否則分離的效果將大打折扣。】以 1800rpm，離心 20min (如果無明顯分層可再次離心)。離心結束後會分成三個色層，以滴管取出中間層的 lymphocytes 至另一離心管中，加入 PBS 至 4cc 混合，取出 100? 數細胞數再離心，倒出上清液之後，把底層離心物打散，之後再加至 4ml PBS，共清洗二次(1200rpm，5min)。每個樣本需要 5×10^5 個細胞數，將最後離心的產物倒去上清液，加入 PBS 至 4cc，取出實驗所需的量至 1.5 μ l tube 的避光褐色管。

先取下之前 NMA 的蓋玻片，slide 回溫，在避光褐色管加入 1 cc 1% LMA 混合，取出 85 μ l 於 slide 上，蓋上蓋玻片於室溫下固化【第二層】（1%LMA 溫度不可太燙，因須與細胞混合，太燙會把細胞燙死(約 37)）。將 slide 放入 Lysis buffer 浸泡，於 4 冰箱冷藏 1 小時【將細胞膜破裂】。將浸泡完的玻片用 dd water 水洗（不可讓玻片接觸空氣太久），再放入預先已放置電泳液的電泳槽浸泡 20 分鐘【電泳液呈鹼性，可使

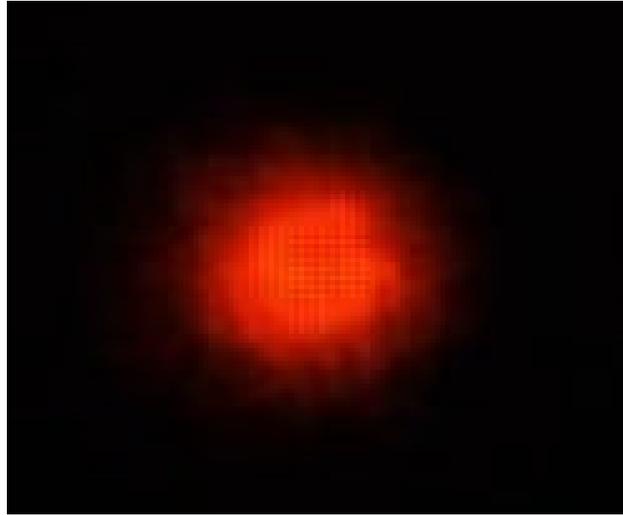
DNA unwinding】，而電泳槽須以鋁箔紙覆蓋避光。電泳（條件：21V；300mA；15min【電泳時間與 Tank 大小有關，越大的 Tank，所需電壓越大，時間越長】，並利用增加或減少電泳液來調整伏特數與毫安培數到標準值）【注意：上述步驟應避免照光，防止額外的 DNA 傷害（覆蓋鋁箔紙）】電泳結束以 dd water 水洗，浸泡 Tris buffer 15 分鐘來中和電泳液（室溫）。再以 dd water 水洗，泡置於甲醇保存 10min【固定細胞】（可保存大約一個月），取出後晾乾（完全乾），再滴上 40 μ l 的 PI (Propidium iodide) 染色，置於螢光顯微鏡觀察。

以彗星尾巴拖曳長度與頭部中心之直徑比和或尾巴 DNA 佔總 DNA 含量比，將 DNA 受害程度分 5 級：

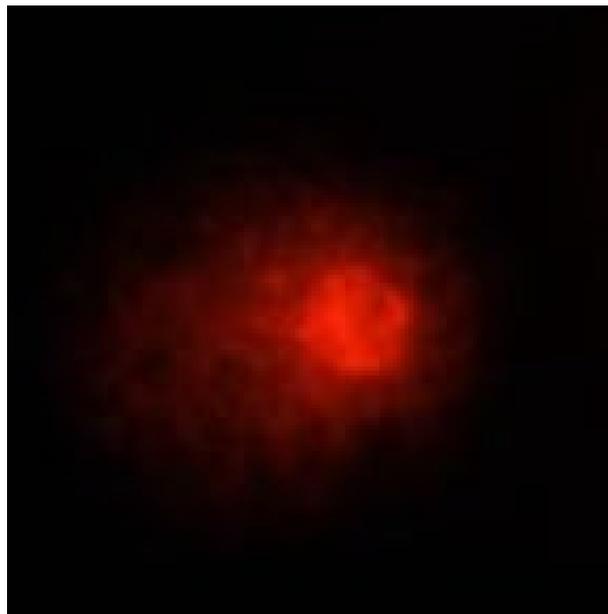
- (1) 無受損程度(no damage)：彗星尾巴 DNA 含量 < 5%，核團大多呈球型；



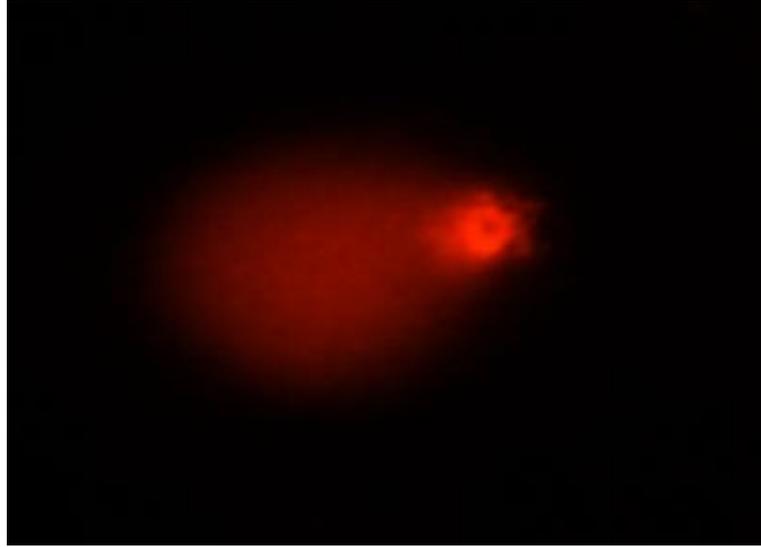
(2) 低程度傷害(low level damage)：彗星尾巴 DNA 含量佔 5-20% ，彗星尾巴長度比頭部直徑短；



(3) 中度傷害(medium level damage)：彗星尾巴 DNA 含量佔 20-40% ，尾巴長度略長於頭部直徑；



(4) 高度傷害(high level damage)：彗星尾巴 DNA 含量佔 40-95%，尾巴長度為頭部直徑 2 倍以上；



(5) 完全傷害(totel damage)：彗星尾巴 DNA 含量 > 95%，幾乎看不到彗星頭部。



【DNA 損傷積分計算】：個體之無傷害細胞數×0 + 低度傷害細胞數×1 + 中度傷害細胞數×2 + 高度傷害細胞數×3 + 完全傷害細胞數×4=個體總積分⁽¹⁰⁶⁾

四、統計方法

使用 SAS 8.0 統計軟體分析吸煙組、二手菸組及非吸菸組孕婦基本資料、相關危險因子（如孕婦年齡、二手菸暴露狀況等）、四個多型性基因（CYP1A1、GSTT1、GSTM1、NAT2）與 DNA 損傷程度及積分等變項之相關，並計算相對危險性及 95% 信賴區間。另以卡方檢定（ χ^2 -test）分析是否呈現分布上之顯著差異，進一步以 DNA 損傷積分高低分組為依變項，其餘危險因子為自變項，利用邏輯斯迴歸作多重危險因子多變項迴歸分析。

五、使用藥劑

(1) DNA 萃取

1. 1X RBC lysis buffer (Bossom, Taiwan)
2. GenoMarker reagent (Bossom, Taiwan)
3. chloroform (Merck, Taiwan)
4. Isopropanol (Merck, Taiwan)
5. 70% ethanol
6. TE buffer

(2) PCR 聚合? 鏈鎖反應

1. Aragose (Promega, USA)
2. Ethidium Bromide (SIGMA, USA)
3. 1.5Mm 10X 聚合? 緩衝液 (Protech, Taiwan)
4. 2.5Mm 去氧核甘三磷酸 (dNTP) (Protech, Taiwan)
5. Primer (Missin Biotech, Taiwan)
6. Taq 聚合? (Taq polymerase) (Protech, Taiwan)
7. Msp I restriction enzyme (Biolabs, USA)
8. Kpn I restriction enzyme (Promega, USA)
9. Taq I restriction enzyme (Biolabs, USA)
10. BamHI restriction enzyme (Biolabs, USA)
11. RE 10X buffer (Protech, Taiwan)
12. 100bp Ladder (Protech, Taiwan)
13. 1X TBE buffer (Amresco)

(3) 彗星試驗 (comet assay)

1. Agarose
 - a. Normal melting point agarose (1%NMA) (Amresco)
 - b. Low melting point agarose (1%LMA) (Amresco)
2. Lysis solution
 - a. 10mM Tris (Merck, Taiwan)
 - b. ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt (Merck, Taiwan)
 - c. 2.5M NaCl (Merck, Taiwan)
 - b. 1% (V/V) Triton X-100 (ICN Biomedicals)
3. Tris–buffer(0.4M Tris, pH 7.5) (Merck, Taiwan)
4. trypan blue (Sigma, USA)
5. Histopaque 1077 (Sigma Chemicals Co. Ltd., Spruce St., USA.)
6. Phosphate buffered saline (PBS) CaCl₂ and MgCl₂ free (Sigma Chemicals Co. Ltd., Spruce St., USA.)
7. Electrophoresis solution : pH > 13
 - a. 1mM Na₂EDTA (Merck, Taiwan)
 - b. 300mM NaOH (Merck, Taiwan)
8. distilled water
9. Propidium iodide (40μPI) (Sigma, USA)

六、實驗材料

1. 紫頭採血管 (EDTA) (greiner bio-one)
2. 22 號真空採血針 (greiner bio-one)
3. 22 號針頭 (greiner bio-one)
4. 15ml 離心管 (IWAKI)
5. 燒杯 (100ml,250ml,500ml,1000ml) (Schott Duran)
6. 乳頭吸管 (Merck, Taiwan)
7. 量筒 (100ml,250ml,500ml,1000ml) (Sibata)
8. 試管架 (Bohlender)
9. reach pipet tips (白、黃、藍) (SSI, USA)
10. 微量離心管 (0.2ml,0.6ml,1.5ml) (SSI, USA)
11. 乳頭滴管 (Costar)
12. 計數玻片 (Marienfeld)
13. 鋁箔紙 (妙潔)
14. 蓋玻片 (Marienfeld)
15. 磨砂玻片 (FEA)

七、使用儀器

1. 高速離心機 (Kubota5100,1300)
2. 4 雙門冰箱 (Whirlpool)
3. 恆溫水浴槽 (Firstek)
4. PCR 機器 (Eppendorf)
5. -20 冰櫃 (Corning)
6. 水平電泳槽 (Major Science)
7. 加熱盤 (Corning)
8. 光學顯微鏡 Nikon Type 104 (Nikon, Japan)
9. 柯達 DCS260 照相系統 (Kodak)
10. 柯達影像分析軟體 1D (Kodak)
11. 螢光顯微鏡 (fluorescence microscope ; Olympus BX51, Japan)

第四章、結果

一、研究對象基本人口學特性分析

本研究依照問卷調查資料將 418 名孕婦分為三組，吸煙組共有 32 人、二手煙組有 244 人及非吸煙有 142 人。吸煙組平均年齡為 28.9 歲，二手煙組為 29.5 歲，非吸煙組為 31.4 歲，三組在統計上具有顯著差異 ($p < 0.001$)。另外在孕婦教育程度、配偶年齡、配偶教育程度等作分析比較，三組均達統計上的顯著差異 ($p < 0.0001$)。吸煙組孕婦吸煙量方面，平均每日吸煙為 0.55 包。二手煙暴露分為家中與工作場所兩部分：與孕婦同住有吸煙習慣者，吸煙組有 20 人(66.7%)，二手煙組有 177 人(74.4%)，另外在家中會聞到煙味者，吸煙組有 19 人(65.5%)，二手煙組有 123 人(54.0%)，以上結果均達統計上顯著意義($p < 0.0001$)。而聞到煙味的程度與所聞到的時間長短均無統計上顯著差異。工作場所會聞到煙味者，吸煙組有 9 人(39.1%)，二手煙組有 117 人(54.7%)，具有統計上顯著差異($p < 0.0001$)，但在聞到的煙味程度與聞到時間的長短均無統計上顯著差異。三組當中有飲酒習慣者，吸煙組為 7 人(22.6%)，二手煙組 13 人(5.5%)，非吸煙組 4 人(2.8%)，具有統計上顯著差異($p = 0.0006$)。其他如在工作場所是否接觸有害物質與可丁寧(Cotinine)濃度等變項在三組間則無統計相關。

二、四種基因型之對偶基因(allele)及基因型分析

表二為四種多型性基因之對偶基因及基因型分佈。CYP1A1 w/w、w/v、v/v 基因型頻率在全體研究對象各為 48.3%、39.5%及 12.2% , 另外在吸煙組當中三種基因型頻率各為 46.9%、40.6%、12.5% , 二手煙組中各為 48.4%、41.8%、9.8% , 非吸煙組當中各為 48.6%、35.2%、16.2% , 均未達到統計上顯著意義。而對偶基因頻率經由 χ^2 -檢定亦無統計上顯著差異。以適合度檢定全體及三組吸煙狀況不同者, 除了非吸煙組外均未達到顯著意義, 且皆符合哈 - 溫平衡定律。

GSTT1 基因型分為無效型及非無效型, 在全體研究對象各佔 54.8% 及 45.2% , 另外在吸煙組各為 53.1% 及 46.9% , 二手煙組各為 54.5% 及 45.5% , 非吸煙組各為 55.6% 及 44.4%。GSTM1 基因型亦分為無效型及非無效型, 在全體研究對象各佔 36.8% 及 63.2% , 另外在吸煙組各為 40.6% 及 59.4% , 二手煙組各為 36.9% 及 63.1% , 非吸煙組各為 35.9% 及 64.1% , 上述經由 χ^2 -檢定均無達到顯著意義。

NAT2 對偶基因依作用限制? 不同可分為 NAT2*4、NAT2*5、NAT2*6、NAT2*7, 這四種對偶基因的分佈在三組研究對象中均無統計上顯著差異。另外依照不同的兩個對偶基因組合共有 10 種基因型, 在三組當中的分佈亦無統計上顯著差異。快慢型分佈方面, 在吸煙組當中,

快型佔 68.8%，慢型佔 31.3%，二手煙組中快型佔 76%，慢型佔 23.8%，非吸煙組中快型佔 76.8%，慢型佔 23.2%，在統計上無顯著差異。

三、DNA 損傷(damage)分析

表三為吸煙狀況與 DNA 損傷之比較。共有 148 名產婦血進行彗星試驗，亦由吸煙狀況分為吸煙組、二手煙組及非吸煙組，在三組當中均以無 DNA 損傷的細胞數最多，分別為 414 個(46.0%)、4311 個(50.7%)、3287 個(60.9%) 細胞數。但吸煙組與二手煙組之孕婦在中度、高度、完全損傷等三種 DNA 損傷程度的細胞數所佔比例均高於非吸煙組，且達到統計上顯著意義($p < 0.0001$)。而利用 DNA 損傷程度的細胞損傷平均數作比較，非吸煙組在 DNA 無傷害及低度傷害程度的細胞損傷平均數比吸煙組和二手煙組較高，而吸煙組及二手煙組在 DNA 中度、高度、完全損傷的細胞損傷平均數皆高於非吸煙組，且利用 t 檢定在統計上除了低度傷害之外，皆達到顯著差異。另外利用 DNA 損傷積分比較，吸煙組與二手煙組之損傷積分均高於非吸煙組，且經由 t 檢定在統計上均達到顯著差異，

表四為孕婦吸煙與 CYP1A1 和 GSTT1 代謝基因之交互作用對 DNA 損傷的影響，吸煙狀況為二手煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + GSTT1 非無效型者，其 OR 值是非吸煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + GSTT1 非無效型(基準組)的 3.82 倍，且具有統計上顯著意義

(95%CI 為 1.23~11.87)。其他組別雖然沒有統計上的顯著差異，但仍可看出隨著吸煙狀況上升其勝算比都較基準組高。

表五為孕婦吸煙與 CYP1A1 和 GSTM1 代謝基因之交互作用對 DNA 損傷的影響，吸煙狀況為二手煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + GSTM1 非無效型者，其 OR 值是非吸煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + GSTM1 非無效型(基準組)的 4.92 倍，且具有統計上顯著意義(95%CI 為 1.77~13.67)，其他組別之勝算比皆較基準組高，但無達到統計上顯著意義。

表六為孕婦吸煙與 CYP1A1 和 NAT2 代謝基因之交互作用對 DNA 損傷的影響，吸煙狀況為二手煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + NAT2 快型者，其 OR 值為非吸煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + NAT2 快型(基準組)的 4.93 倍，且具有統計上顯著意義(95%CI 為 1.97~12.35)，吸煙組且基因型組合為 CYP1A1 w/w 與 w/v + NAT2 快型者其 OR 值亦較基準組高，但未達到統計上顯著意義。

表七為 DNA 損傷積分與相關危險因子之單變項及多變項回歸分析，孕婦年齡 30 歲以上的 OR 值為 30 歲以下者的 1.2 倍，有飲酒習慣者的 OR 值為無飲酒習慣者的 1.6 倍，工作場所有接觸危害物質者其 OR 值為無接觸者的 1.4 倍，均無達到統計上顯著意義。另外吸煙狀況與可丁寧

濃度分組分析 DNA 損傷程度，吸煙組的 OR 值為非吸煙組的 4.8 倍，二手煙組為非吸煙組的 6.4 倍，皆達到統計上顯著意義；可丁寧濃度高者其 OR 值為濃度低者的 1.5 倍，濃度中者為濃度低者的 1.4 倍，未達到統計上顯著差異。而在代謝多型性基因方面，各基因組合都較其基準組 OR 值高，但均未達到統計上顯著意義（表八）。

第五章、討論

本研究以橫斷式研究法探討孕婦吸煙及暴露二手煙對其體內可丁寧濃度之影響及 DNA 損傷程度之相關。研究對象是從台中地區三所公私立醫院收集孕婦資料及血液與尿液樣本進行分析，並依照其問卷調查之吸煙狀況分為吸煙組、二手煙組及非吸煙組共 418 位。比較性別及教育程度後，發現吸煙組孕婦的平均年齡較二手煙及非吸煙組低，而教育程度為國、高中(職)者亦以吸煙組較其他兩組佔高比例，並達到顯著差異，顯示研究對象中有吸煙習慣者較其餘兩組偏向稍低年齡層且教育程度較低。可丁寧是尼古丁的主要代謝產物，過去有研究利用問卷調查女性吸煙狀況並測量尿中可丁寧濃度，發現回答有吸煙者其可丁寧濃度較回答無吸煙者高⁽¹⁰⁰⁾，本研究亦有類似的結果，吸煙組的可丁寧濃度為 2.2 ± 4.0 ng/ml，只比非吸煙組的 1.8 ± 4.7 ng/ml 稍高一些，但無達到統計上的顯著差異。

環境與遺傳的交互作用對於人體的健康與疾病的產生是相當重要的因素，近年來由於工業化、社會經濟及文化快速發展的結果，使得吸煙人口有上昇之趨勢。吸煙及二手煙暴露對於健康之危害已有許多相關研究，香煙中所含的 PAHs 與芳香胺等化合物在人體會經由代謝而產生之嗜

電性中間產物，這些活化產生的中間產物可能會造成 DNA 損傷，亦會增加誘發肺癌的危險性^(31, 97.)。在動物實驗方面，暴露於香煙側流煙的老鼠，在心臟、肝臟及肺臟組織細胞會造成 DNA 氧化性的損傷⁽³²⁾。此外有研究指出香菸中的硝基胺（N-nitrosamines）會增加人體 DNA adduct 的產生⁽⁹⁸⁾。另一方面，代謝毒物酵素的基因多型性亦是影響個體是否容易罹患癌症的重要因素，例如 CYP1A1 的基因多型性表現與吸煙者罹患癌症的危險性有相關聯⁽⁹⁹⁾，女性吸煙者如果帶有 CYP1A1 野生/變異型或變異/變異型，會增加 DNA adduct 的產生，且會導致乳癌危險性上升⁽⁷⁰⁾。另外懷孕婦女吸煙且 CYP1A1 基因型為野生/變異型或變異/變異型者，會生下低體重新生兒的危險性比基因型為野生/野生型者高出 3.2 倍⁽¹⁰¹⁾。CYP1A1 Msp I 變異型分佈在本研究中吸煙組為 12.5%，二手煙組為 9.8%，非吸煙組為 16.2%，其比率與亞洲人接近（13%）⁽⁴⁸⁾，亦與本實驗室先前之研究結果相近（18.3%）⁽¹⁰⁶⁾。CYP1A1*v 的對偶基因頻率分布在本研究中吸煙組為 0.33，二手煙組為 0.31，非吸煙組為 0.34，此分佈與以前的研究略有差異（0.42）⁽⁴⁰⁾。

巯基基硫轉移酵素 GST 與 N-乙醯基轉移酵素(N-acetyltransferases，NAT)均為第二期代謝酵素，與發展成某些癌症有關。巯基基硫轉移酵素主要將 CYP1A1 酵素所產生的中間產物增加其親水性，將之排出體外。

GSTM1 與 GSTT1 基因型與各種癌症或疾病形成有關。Bennett 等人的研究顯示不吸煙的婦女受到環境二手煙的暴露之下，帶有 GSTM1 無效型者得到肺癌的危險性是非無效型的 2.6 倍⁽¹⁰²⁾。Sirku 等人的研究發現以單一基因型去探討肺癌危險性時並無顯著相關，但結合 GSTT1 和 GSTM1 皆為無效型時則發現會使罹患肺癌的危險性上升兩倍⁽⁵⁶⁾。Wang 等人的研究發現，吸煙且帶有 GSTT1 無效型的懷孕婦女，生下低體重新生兒的危險性是不吸煙且 GSTT1 為非無效型者的 3.5 倍⁽¹⁰¹⁾。GSTM1 基因為無效型的比例在台灣族群為 45-63%^(50, 51)，本研究吸煙組的比例為 40.6%，二手煙組為 36.9%，非吸煙組為 35.9%，與過去研究比較稍低，但本實驗室先前研究結果近似 (41.7%)⁽¹⁰⁶⁾。而 GSTT1 基因為無效型的比率在本研究中吸煙組為 53.1%，二手煙組為 54.5%，非吸煙組為 55.6%，此基因型分佈在過去的研究顯示台灣人為 49.8%⁽¹⁰³⁾，本實驗室先前之研究結果為 43.3%⁽¹⁰⁶⁾。

Olga 等人的研究指出，若女性為吸菸 20 年以上且合併 NAT2 慢型者，會使乳癌的危險性增加 2.29 倍⁽⁶⁹⁾。Adeline 等人的研究顯示在非吸煙者的女性當中，NAT2 慢型可能扮演著增加肺癌危險性的角色⁽⁶⁷⁾。另外，快型與增加結腸直腸癌危險性有關^(72, 73)，慢型與增加膀胱癌危險性有關^(63, 74, 75, 76)。NAT2 慢型的分佈在各個人種之中的差異相當大，例如

英國高加索人慢型佔 66.1%，南非黑人佔 39.6%⁽⁶⁶⁾，本研究慢型的比率為 24.2%，類似於過去研究台灣女性的比例為 23.1%⁽¹⁰⁴⁾，本實驗室先前之研究結果為 21.7%⁽¹⁰⁶⁾。

彗星試驗(comet assay)是能夠快速偵測 DNA 損傷的一種技術，過去有許多研究以彗星試驗探討吸煙對於 DNA 損傷之影響。Stilianos 等人從不同吸煙習慣的人身上取得淋巴球細胞，經由過氧化氫(H₂O₂)與紫外光處理後進行彗星試驗，發現吸煙者有較嚴重且顯著程度的 DNA 損傷⁽¹⁰⁵⁾。Florek 在懷孕老鼠暴露香菸煙霧的試驗，也發現母鼠和幼鼠 DNA 斷裂的情況均顯著，且母鼠 DNA 斷裂的情況較幼鼠嚴重⁽⁸⁵⁾。Wolz 等人將細胞暴露於乾淨空氣、nitrogen dioxide 和香煙側流煙當中，利用彗星試驗觀察 DNA 受損情況，發現暴露於側流煙的 DNA 斷裂情況與暴露程度呈現劑量效應⁽⁸⁶⁾。Alok 等人發現吸煙者與非素食主義者其 DNA 損傷程度皆高於非吸煙者與素食主義者⁽⁸⁸⁾。本研究以彗星試驗探討孕婦吸煙及暴露二手煙對 DNA 損傷之影響，發現吸煙組與二手煙組 DNA 損傷程度皆比非吸煙組較為嚴重，顯示吸煙及暴露二手煙的確會加重 DNA 損傷情況。

過去有相當多的研究探討吸煙者合併不同基因型觀察其易感性對疾病或 DNA adduct 產生之影響。Pervez 等人的研究發現吸煙者為 CYP1A1 野生/變異型或變異/變異型同時帶有 GSTM1 無效型時，會有較多的 DNA

adduct 產生⁽⁷⁰⁾。而 Georgiadis 等人的研究也有相同的結果，且發現暴露二手煙合併帶有前述兩種基因型時，亦會增加 DNA adduct⁽³⁷⁾。Wang 等人的研究發現，吸煙者為 CYP1A1 變異/變異型並帶有 NAT2 慢型時，其 DNA adduct 的量亦會增加，但統計上並不顯著。另外有許多研究合併基因型觀察吸煙對疾病的影響。Hou 等人的研究顯示當吸煙者同時帶有 GSTM1 無效型與 NAT2 慢型時，會增加? 狀上皮癌的危險性⁽⁶⁸⁾。有研究指出當吸煙者為 CYP1A1 變異/變異型時，帶有 GSTM1 非無效型能夠降低肺癌的危險性⁽³⁸⁾。女性若帶有 CYP1A1 變異/變異型及 GSTM1 非無效型者可能會使子宮頸鱗狀上皮癌的危險性增加 5.1 倍⁽⁴³⁾。本研究首次以彗星試驗做為 DNA 損傷的一個指標，分析 148 名孕婦吸煙狀況與其四種基因型間是否產生交互作用而造成 DNA 損傷，發現孕婦暴露二手煙且帶有 CYP1A1 w 對偶基因與 GSTT1 非無效型 (non-null)，或帶有 GSTM1 非無效型 (non-null)，或 NAT2 快型時，DNA 損傷的危險性會較其基準組高且具有統計上顯著意義，而其餘各組雖然危險性皆高於基準組，但均未達到顯著意義。

Andree 等人的研究利用可丁寧濃度做為指標，發現婦女如在懷孕期間吸煙，新生兒的可丁寧濃度會隨之升高，並會增加新生兒產生亞急性組織缺氧 (subacute hypoxia) 之危險性⁽¹⁰⁷⁾。分析吸煙狀況與可丁寧濃度

對於 DNA 損傷危險性的影響，發現吸煙組的危險性是非吸煙組的 4.8 倍，二手煙組是非吸煙組的 6.4 倍，皆具有顯著意義；而可丁寧濃度高組為濃度低組的 1.5 倍，濃度中組為濃度低組的 1.4 倍，但無顯著意義。因此由本研究顯示孕婦吸煙狀況的不同與 DNA 損傷具有相關性，但可丁寧濃度的相關性不顯著。

第六章、結論

雖然本研究沒有測定孕婦吸菸或暴露二手煙之環境中的 PAHs 等化合物，但在過去許多研究顯示 CYP1A1、GSTM1、GSTT1 及 NAT2 四種多型性代謝基因與香煙中的 PAHs 等化合物之代謝有關，進入體內的 PAHs 等化合物若無經由代謝解毒機制排出體外，可能會對人體細胞及 DNA 進行攻擊而造成損傷。本研究利用彗星試驗首次探討孕婦吸煙狀況和多型性基因對 DNA 損傷之關係。結果發現吸煙或暴露二手煙，會造成 DNA 不同程度之損傷，與過去相關研究結果類似。而吸煙狀況結合基因型之分析雖有看出危險性，但無顯著意義。另外分析可丁寧對 DNA 損傷之影響，亦無發現顯著相關性。

第七章、參考文獻

1. Clifford E. Berkman, Sang B. Park, Steven A. Wrighton and John R. Cashman. In vitro-in vivo correlations of human (S)-nicotine metabolism. *Biochemical Pharmacology* 1995 ; 50 No. 4 : 565-570.
2. Anthony R. Tricker. Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 2003;183:151-173.
3. 行政院環境保護署：環境菸煙（二手煙）危害知多少。台北，1993。
4. Shopland DR. Smoking and Tobacco Control Program, National Cancer Institute, 6310 Executive Blvd, MSC 7337 Bethesda, MD 20892-7337. Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking, *Environ Health Perspect* 1995; 103: Suppl 8: 131-42.
5. Kabat, Geoffrey C. Taylor, Aspects of the epidemiology of lung cancer in smokers and nonsmokers in the United States, *Lung Cancer* 1996 ; 15, Issue: 1:1-20
6. CDC Women and Smoking A Report of the Surgeon General –2001 Health Consequence of Tobacco Use Among Women, Fact Sheet Sep 23, 2003
7. Schilling RSF, Bouhuys A, Sudan BJL, Brody B. Breathing other people's smoke 1978: 895.
8. Leong JW, Dore ND, Shelley K, Holt EJ, Laing IA, Palmer LJ, LeSouef PN. The Elimination Half-Life of Urinary Cotinine in Children of Tobacco-Smoking Mothers. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 1998; 11: 287-290.
9. Benowitz N L, Kuyt F, Jacob P, Jones R T, Osman A. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34: 604–611.

10. United States Surgeon General. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of Progress Washington DC office on smoking and health, 1989.
11. Daniel Keyler, Paul R. Pentel, Gwendolyn Kuehl, Greg Collins, Sharon E. Murphy. Effects of nicotine infusion on the metabolism of the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rats. *Cancer Letters* 2003; 202 :1-9.
12. Lynne E. Wangenknecht, Teri A. Manolio, Stephen Sidney, Gregory L. Haley. Environmental Tobacco Smoke Exposure as Determined by Cotinine in Black and White Young Adults: The CARDIA Study. *Environmental Research* 1993; 63: 39-46 .
13. 台灣省菸酒公賣局：台灣地區菸酒市場調查提要報告（第二十三次）-1996年。台北：公賣局，1997。
14. 「民國九十一年國民健康促進知識、態度與行為調查」之成果報告_國人之健康行為初探。行政院衛生署國民健康局，九十一年。
15. CDC Women and Smoking A Report of the Surgeon General –2001 Tobacco Use and Reproductive Outcomes Fact Sheet Sep 23, 2003
16. Sopori, Mohan L.; Kozak, Wieslaw, Immunomodulatory effects of cigarette smoke, *Journal of Neuroimmunology* 1998; 83, Issue: 1-2: 148-156
17. Spandorfer, Steven David. Cigarette smoking in the menopausal woman. *Primary Care Update for OB/GYNs* 1996; 3, Issue: 6:212-215.
18. Law, M.R. Passive smoking, heart disease and cancer, *Food and Chemical Toxicology* 1997; 35, Issue: 12: 1232.
19. Siener, Karen; Malarcher, Ann; Husten. Corinne, Women and smoking: patterns, health effects, and treatments, *Primary Care Update for OB/GYNs* March - April 2000; 7, Issue: 2,;pp. 77-84.

20. 衛生資料統計。中華民國行政院衛生署。
<http://www.doh.gov.tw/lane/statist/89>
21. Steenland *et al.* Environmental tobacco smoke and coronary heart disease, *Circulation* 1996, 94, 622.
22. Benowitz NL. Biomarkers of environmental tobacco smoke exposure. *Environ Health Perspect* 1999; 107 suppl 2: 349-55.
23. Royal College of Physicians. Smoking and young. *Tob control* 1992; 1: 231-5
24. Wu MT, Lee LH *et al.* Lifetime exposure to environmental tobacco smoke and cervical intraepithelial neoplasms among non smoking Taiwanese women. *Arch Environ Health*. 2003; 58(6): 353-9.
25. Zhu, Shu-Hong; Valbø, Annelill. Depression and smoking during pregnancy. *Addictive Behaviors* July - August, 2002; 27, Issue: 4 649-658.
26. Shiono PH, Klebanoff MA, Nugent RP, Cotch MF, Wilkins DG, Rollins DE, Carey JC, et. al., The impact of cocaine and marijuana use on low birth weight and preterm birth: A multicenter study. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* November, 1995; : 51, Issue: 2:190.
27. DeLorenze, Gerald N, Kharrazi, Martin; Kaufman, Farla L, Eskenazi, Brenda; Bernert, John T., Exposure to Environmental Tobacco Smoke in Pregnant Women: The Association between Self-Report and Serum Cotinine. *Environmental Research* September, 2002; 90, Issue: 1:21-32.
28. Stick S M, Burton P R, Gurrin L, Sly P D, LeSouëf P N. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *The Lancet* October 19, 1996; : 348, Issue: 9034:1060-1064.
29. Peter J. Gergen, Environmental tobacco smoke as a risk factor for respiratory disease in children. *Respiration Physiology* 2001;128: 39-46.

30. Kilbane, Sheila; Knudtson, Eric; Vesha, Kathy. Smoking cessation in women. Primary Care Update for OB/GYNS September - October, 2002; 9, Issue: 5:164-168.
31. Schoket, Bernadette. DNA damage in humans exposed to environmental and dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Research March 8, 1999; 424, Issue: 1-2:143-153.
32. Howard David J, Briggs Laura A, Pritsos Chris A. Oxidative DNA Damage in Mouse Heart, Liver, and Lung Tissue Due to Acute Side-Stream Tobacco Smoke Exposure. Archives of Biochemistry and Biophysics April 15, 1998; 352, Issue: 2:293-297.
33. Lulufer Tamer, Bahadir Ercan, Ahmet Camsarn. Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. Basic Rs Cardiol 2004; 99.
34. Nebert DW, Russeli DW. Review Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet , 2002;360:1155-1162.
35. Taioli Emanuela, Crofts Frances, Trachman Julie, Bayo Sine, Toniolo Paolo, Garte Seymour J. Racial differences in CYP1A1 genotype and function. Toxicology Letters May, 1995; 77, Issue: 1-3:357-362
36. Kihara M, Noda K. Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. Department of Epidemuology, Cancer Center Research institute, Yokohama. Carcinogenesis 1995 ; 16 : 2331-6
37. Georgiadis P, Demopoulos NA, Topinka J, Stephanou G, Stoikidou M, Bekyrou M, Katsouyianni K, et. al. Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. Toxicology Letters April 1, 2004; 149, Issue: 1-3:269-280
38. Haugen Aage. Cancer susceptibility genes and molecular epidemiology. Lung Cancer August, 1997; 18, Supplement 2:71-72

39. 廖永生：人類肺癌組織及細胞株中多環芳香烴類受器 Aryl Hydrocarbon Receptor, Ah-Receptor Nuclear Translocator 和 Cytochrome P4501A1 之表現情形。中山醫學院毒理學研究所碩士論文,2000.
40. 鄭義麟：細胞色素 P450 酵素 1A1、巯胺基硫轉移酵素 M1 和 P1 及甲烯基四氫葉酸還原酵素之基因多型性與罹患肺癌危險性之巢疊病例對照研究。國防醫學院公共衛生研究所碩士論文,2003.
41. Hildebrand CE, Gonzalez FJ, McBride OW, Nebert DW. Assignment of the human 2,4,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible cytochrome P-450 gene to chromosome 15. *Nucleic Acids Res* 1985;13:2009-2016.
42. Goodman, Marc T.; McDuffie, Katharine; Hernandez, Brenda; Bertram, Cathy C.; Wilkens, Lynne R.; et. al., CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 Polymorphisms and the Risk of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions in a Multiethnic Population. *Gynecologic Oncology* May, 2001; : 81, Issue: 2:263-269.
43. Chen S, Xue K, Xu L, Ma G, and Wu J. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in Chinese population. *Mutation Res* 2001; 458(1-2): 41-7.
44. 鄭雅文：環境致癌物暴露和人類乳突瘤病毒感染與女性無吸煙者之相關。中山醫學大學醫學研究所碩士論文，2001.
45. Pluth Janice M, Ramsey Marilyn J, Tucker James D. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* February 16, 2000; 465, Issue: 1-2:101-111
46. 葉斯清：利用短暫殖入 *gst* 系統探討 rat mu class Glutathione S transferase 對鼠肝細胞抵抗致癌物質之影響。中山醫學院生物化學研究所碩士論文，2001.
47. Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, Nalinakumari KR, Pillai MR. Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncology* October, 2001; 37, Issue: 7:593-598.

48. 鄭婷之:台灣地區女性乳癌與女性賀爾蒙代謝物去毒基因多形性之病例對照研究。國立臺灣大學流行病學研究所碩士論文，2002.
49. Lin HJ, Han C, Ethnic distribution of the glutathione s-transferase mu-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Cancer*.1994 ; 15 : 1077-1081.
50. 洪佳嘉：口腔小咽癌之流行病學研究。台大公衛所碩士論文，1999.
51. 簡吟曲：GSTM1，GSTT1 基因型及其他危險因子與鼻咽癌相關性之流行病學研究。台大公衛所碩士論文，1996.
52. Nazar-Stewart Valle, Vaughan Thomas L, Stapleton Patricia, Van Loo Jason, Nicol-Blades Berta, et.al, A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer. *Lung Cancer* June, 2003; 40, Issue: 3:247 – 258.
53. Falck GCM, Hirconen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H . Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research* 1999;441: 225-237.
54. Wang Jingwen, Deng Yifu, Cheng Jinglei, Ding Jianmin, Tokudome Shinkan. GST genetic polymorphisms and lung adenocarcinoma susceptibility in a Chinese population. *Cancer Letters* November 25, 2003; 201, Issue: 2:185-193.
- 55.馮清世：農藥暴露及 GST 基因型多型性與巴金森氏病感受性的研究。台大臨床醫學研究所碩士論文，2003.
56. Sirkku T. Saarikoskil, Maria Reinikainen ,et al. Effect of GST and NAT genotype on the lung cancer risk. International Agency for Research on Cancer. F-69372 Lyon Cedex 08,France.
57. Jesus Gomez-Catalan ; et al. Glutathion S-transferase polymorphisms in a north-west Mediterranean population and their relation to lung cancer susceptibility. Hospital Clinic I Provincial, Universitat de Barceiona, spain.

58. Helena Barnova ; et al, GSTM1 and CYP1A1 gene polymorphisms in French patients with cystic fibrosis. Department of Pediatrics, C.H.U
59. Jhavar Sameer, Sarin Rajiv, Mulherkar Rita, Benner Axel, Prakash Agarwal Jai, Dinshaw Ketayun. Glutathione S-transferase M1 or T1 null genotype as a risk factor for developing multiple primary neoplasms in the upper aero-digestive tract, in Indian males using tobacco. Oral Oncology January 2004; 40, Issue: 84-91.
60. Goergens, H.W., Specific Factors Leading to Interindividual Variability in Response to Occupational Toxicants. Toxicology Letters August, 1995; 78, Supplement 1: 6
61. Satoshi Nakago, Ruth M. Hadfield ; et al. Association between endometriosis and N-acetyl transferase 2 polymorphisms in a UK population. Molecular Human Reproduction 2001;7, No.11:1079-1083.
62. M-W Yu; C-I Pai; et al. Role of N-acetyl transferase polymorphisms in hepatitis B related hepatocellular carcinoma : impact of smoking on risk. Gut; Nov 2000; 47:703-709
63. Hein David W, Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis September 30, 2002; 506-507:65-77.
64. Chu Chen, Sherianne Ricks; et al. N-acetyltransferase 2 polymorphisms, cigarette smoking and alcohol consumption, and oral squamous cell cancer risk. Carcinogenesis ,2001; 22 no. 12:1993-1999.
65. Mitchell Kent R, Warshawsky David. Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. Toxicology Letters March 20, 2003; 139, Issue: 1:11 – 23.
66. Loktionov Alexandre, Moore William, Spencer Steven P, Vorster Hester, Nell Theo, O' Neill Ian K, et. al. Differences in N-acetylation genotypes between Caucasians and Black South Africans: implications for cancer prevention. Cancer Detection and Prevention March, 2002; 26, Issue: 1: 15-22

67. Adeline Seow, Bin Zhao; et al. NAT2 slow acetylator genotype is associated with increased risk of lung cancer among non-smoking Chinese women in Singapore. *Carcinogenesis* 1999; 20 no.9 :1877-1881.
68. Sai-Mei Hou, David Ryberg; et al. GSTM1 and NAT2 polymorphisms in operable and non-operable lung cancer patients. *Carcinogenesis* 2000; 21 no.1 : 49-54,
69. Olga L H, Petra H M Peeters; et al. NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotypes may increase postmenopausal breast cancer risk in long-term smoking women. *Pharmacogenetics* 2003, 13:399-407
70. Pervez F F, Melissa L B; et al. Aromatic DNA adducts and polymorphisms of CYP1A1, NAT2, and GSTM1 in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23 no.2 :301-306.
71. Wang Y; et al. Effects of genetic polymorphism of metabolic enzymes, nutrition, and lifestyle factors on DNA adduct formation in lymphocytes. *IND. HEALTH* 1998; 36/4:337-346.
72. Temitope O. Keku, PhD, Robert C; et al, Family History of Colon Cancer. *Am J prev Med* 2003;24(2): 170-176
73. J.P.Gil and M.C.Lechner. Increased frequency of wild-type arylamine-N-acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in Portuguese patients with colorectal. *Carcinogenesis* 1998; 19 no.1:37-41.
74. K. Golka, F. Gleseler; et al. Elevated bladder cancer risk and occupational exposure to azo dyes. Department of Statistics, University of Dortmund, Germany
75. Jurgen Brockmoller, Ingolf Cascorbi; et al, Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicology Letters* 1998; 102-103:173-183

76. Reckwitz T, Golka K, Kempkes M, Cascorbi I, Blaszkevicz M, Roots I, Bolt HM, Schulze H. The polymorphic enzymes N-acetyltransferase 2 and glutathione S-transferase M1 in bladder cancer patients. *European Journal of Cancer Part A* September, 1997; 33, Supplement 8:S31.
77. Lisbeth E. Knudsen, Hannu Norppa; et al. Genotoxic damage in Danish busdrivers. National institute of Occupational Health, Finland; Institute of Environmental and Occupational Medicine, Denmark.
78. Zielinska E, Wojciech N; et al. Arylamine N-Acetyltransferase (NAT2) Gene Mutations in Children with Allergic Diseases. *Clin Pharmacol Ther.* 1997; 62:635-642.
79. Maria Klaude, Strefan Eriksson; et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research* 1996; 363:89-96.
80. Fekadu Kassie, Wolfram Parzefall; et al, Single cell electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research* 2000; 463:13-31
81. McNamee JP, McLean JRN, Ferrarotto CL, Bellier PV. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research* 2000; 466: 63-69.
82. Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ, Wei BX, Lou X, Liu WW, Lao XQ; et. al. Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* July 21, 1999; 444, Issue: 1:1-6.
83. Poli P, Buschini A, Spaggiari A, Rizzoli V, Carlo-Stella C, Rossi C. DNA damage by tobacco smoke and some antitubercular drugs evaluated using the Comet assay. *Toxicology Letters* September 5, 1999; 108, Issue: 2-3: 267 – 276.
84. Lam TH, Zhu CQ, Jiang CQ. Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* March 25, 2002; 515, Issue: 1-2:147-157.

85. Florek E, Tadrowska M, Szyfter K. Tobacco smoke-induced DNA strand breaks in rat estimated by comet assay. *Toxicology Letters* July, 1998; 95, Supplement 1:186.
86. Wolz L, Krause G, Scherer G, Aufderheide M, Mohr U. In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food and Chemical Toxicology* June, 2002; 40, Issue: 6: 845-850.
87. Mohankumar MN, Janani S, Prabhu BK et al. DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Mutation Research* 2002; 520: 179-187.
88. Dhawan A, Mathu N, Seth PK. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* March 1, 2001 : 474, Issue: 1-2: 121-128.
89. Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK; et al. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* April 13, 2000; 467, Issue: 1: 21-30.
90. Danadevi K, Roya R , Saleha BB, Hanumanth RP. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology* 2003;187: 183-193.
91. Lebailly P, Vigreux C; et al. Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay.
<http://www.elsevier.com/locate/mrgenomics>
92. Grover P, Saleha BB, Dana DK, Begum S. In vivo genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay. *Toxicology* 2001; 167: 191–197.

93. Michael Kiffe., Peter Christen, Peter Arni. Characterization of cytotoxic and genotoxic effects of different compounds in CHO K5 cells with the comet assay (single-cell gel electrophoresis assay). *Mutation Research* 2003; 537: 151–168.
94. Sardas S, Karabiyik L, Aygun N, Karakaya AE. DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutation Research* 1998; 418: 1-6.
95. 楊慧婷：彗星分析法評估氯乙烯聚合工人DNA傷害之研究。台大職業醫學與工業衛生研究所碩士論文，2002。
96. 薄榮怡：蔬菜對活性氮化物生物效應影響之研究。國立中興大學食品科學系碩士論文，2001。
97. Leslie ES, Mikhail FD, William PB, Haiying Li, Shantu Amin, Gerd PP. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic Hydrocarbons. *Journal of the National Cancer* May 17 2000;92(10): 803-811.
98. Stephen SH. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation Research* 1999; 424: 127–142.
99. McLemore TL, Adelberg S, Liu MC, McMahon NA, Yu SJ, Hubbard WC, Czervinski M, Wood TG, Storeng R, Lubet RA, Eggleston JC, Boyd MR, and Hines RN. Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst* 1990; 82: 1333–1339.
100. David AW, Neal RB, Dariene M, Richard AW. The discrepancy between self-reported smoking status and urine cotinine levels among woman enrolled in prenatal care at four publicly funded clinical sites. *Journal of Public Health Management and Practice* Jul/Aug 2003; 9(4): 322-325.
101. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2002; 287: 195-202.

102. Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vahakangas KH, et al. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91: 2009-2014.
103. 王克揚，林肇堂，陳建仁，謝玲玲 (1998) 癌症感受性基因之基因型與胃癌的相關性研究，*中華衛誌* 17，No.3
104. 葉志清：大腸直腸癌的危險因子：基因與環境之交互作用。台大環境衛生研究所博士論文，2003.
105. Stilianos MP, Eftichia P, Smaragdi T. Effect of air pollution and smoking on DNA damage of human Lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 36: 243-249.
106. 李怡伽：乳癌與易感性多型性基因的相關性。中國醫藥學院環境醫學研究所碩士論文，2001.
107. Andree G, Frcsc MD, Sherry L, et al. Maternal smoking and fetal erythropoietin levels. *Journal of Obstetrics & Gynecology* 2000; 95(4):561-564.
108. Jacqz AE, Zhang D, Maillard G, Luton D, Andre J, Oury JF. Maternal smoking during pregnancy and nicotine and cotinine concentrations in maternal and neonatal hair. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2002; 109: 909-911.
109. Eric J, Beatrice G, Ganesh A, Philippe T, Charles R. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 25-29.
110. Maria TZ, Ryszard B, Edward RT. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril* 1999; 72: 330-335.