



中國醫藥大學  
臨床醫學研究所  
碩士學位論文

CYP1A1 MspI 及 GST M1 基因多型性  
與眼翳發生的關聯

Association between the risk of  
pterygium and genetic polymorphism in  
CYP1A1 MspI and GST M1 genes

指導教授：蔡宜佑 教授

共同指導教授：蔡輔仁 教授

顧正崙 助理教授

研究生：羅育倫

中華民國九十九年六月

## 中文摘要

### 研究目的

研究細胞色素P450 1A1基因(*CYP1A1*)及麩胺硫轉移酵素MI基因(*GSTM1*)多型性與眼翳(pterygium)發生的關聯。細胞色素P450 1A1及麩胺硫轉移酵素MI都是參與多環芳香烴化合物(PAH)代謝的酵素，BaP 7,8-diol 9,10-epoxide (BPDE) 是多環芳香烴化合物苯并(a)芘(BaP)極具生物活性的中間代謝產物，會攻擊 DNA 形成 BPDE-DNA共價鍵結物，並導致 *p53*基因的突變，之前的研究指出，眼翳組之中 BPDE-like DNA共價鍵結物含量與 *CYP1A1*基因多型性有顯著的關聯性，因此本研究進一步研究 *CYP1A1*及 *GSTM1*基因多型性與眼翳發生的關聯。

### 研究方法

本研究共收集了205個眼翳切片組織與206個正常對照週邊血液檢體，將檢體DNA經由純化萃取，先以聚合酶連鎖反應將標片段放大，再利用限制酶片段多型性的方法，以電泳決定 *CYP1A1*與 *GSTM1*基因的多型性，並進一步統計分析 *CYP1A1*與 *GSTM1*的基因型多型性在眼翳組織與正常對照組間的差異。

### 研究結果

本研究發現 *CYP1A1*基因多型性的分佈在眼翳組織與正常對照組間有顯著的差異( $p=0.017$ )，但在 *GSTM1*基因多型性的分佈在兩組間並沒有發現有顯著的

差異( $p=0.952$ ). *CYP1A1* T/C變異型發生眼翳狀贅的機會是野生型T/T的1.372倍(勝算比1.372, 95% 信賴區間=0.906-2.079,  $p=0.135$ ), *CYP1A1* C/C變異型發生眼翳狀贅的機會是野生型T/T的2.711倍(勝算比2.711, 95% 信賴區間=1.331-5.524,  $p=0.006$ ), 而*GSTM1*基因的變異型比起野生型並沒有統計上顯著增加的勝算比。

## 研究結論

*CYP1A1*基因的多型性與眼翳發生有顯著的關聯, *CYP1A1*基因的多型性或許可成為預測眼翳發生的預測因子, 此外, 依此研究我們推論除了紫外線暴露外, 環境中的污染物質也可能是眼翳發生的影響原因之一。



關鍵字：眼翳, 細胞色素 P450 1A1, 麩胺硫轉移酵素 M1, 多型性, 多環芳香烴, 苯并(a)芘, BPDE

## Abstract

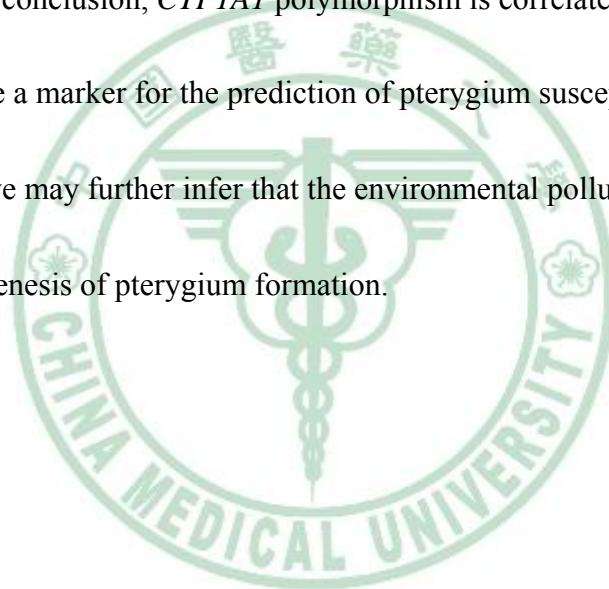
**Purpose:** To study the association between the risk of pterygium and genetic polymorphism in *cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)* and *glutathione S-transferase Mu1 (GST M1)*. Both CYP1A1 and GST M1 have been demonstrated to be involved in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). BaP 7,8-diol 9,10-epoxide (BPDE), an ultimate metabolite of benzo(a)pyrene (BaP), attacks deoxyguanosine to form a BPDE-N2-dG adduct resulting in *p53* mutations. Our previous report indicated that BPDE-like DNA adduct levels in pterygium was associated with *CYP1A1* gene polymorphisms. Therefore, we hypothesize that the genetic polymorphisms of *CYP1A1* and *GST M1* increase the risk for pterygium.

**Methods:** 205 pterygial specimens and 206 normal controls were collected in this study. For the analysis of *CYP1A1* and *GST M1* gene polymorphisms, DNA samples were extracted from pterygium specimens and blood cells of normal controls respectively and then subjected to polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the determination of mutation and genotype of the *CYP1A1* and *GST M1* genes.

**Results:** There was a significant difference between the case and control groups in

the *CYP1A1 MspI* genotype ( $p=0.017$ ) but not in *GST M1* ( $p=0.952$ ). The odds ratio of the *CYP1A1* T/C genotype polymorphism was 1.372 (95% CI=0.906-2.079,  $p=0.135$ ) and the C/C genotype polymorphism was 2.711 (95% CI=1.331-5.524,  $p=0.006$ ), compared to the T/T wild-type genotype. The *GST M1* polymorphisms did not have an increased odds ratio compared with the wild type.

**Conclusion:** In conclusion, *CYP1A1* polymorphism is correlated with pterygium and might become a marker for the prediction of pterygium susceptibility. According to this research, we may further infer that the environmental pollution may also play a role in the pathogenesis of pterygium formation.



Key words: pterygium, CYP1A1, GST M1, polymorphism, PAH, BaP, BPDE

## 誌謝

感謝蔡宜佑主任二年來的辛苦指導，讓我有這個機會除了在臨床工作外，還能有一窺基礎醫學研究堂奧的機會，不論在臨床或者研究上，都給予我很大的支持，讓我獲益良多。蔡宜佑主任不論在臨床或者研究上的傑出表現，都是我的楷模。還要感謝顧正崙老師每每讓我茅塞頓開的研究討論，心中有關研究任何的疑難雜症，老師都能抽絲剝繭、非常邏輯的給我解答與指導，顧正崙老師在基礎醫學研究的精神與對學問來龍去脈的掌握讓我深感佩服。感謝鄭雅文老師於基礎研究與實驗的耐心教導，即使在下班後甚至周末假期，常常都還可以在實驗室發現老師的身影，老師對基礎醫學研究的熱忱深深的讓我佩服，特別還要感謝老師實驗室的婉茹，一個步驟、一個步驟耐心的帶著我做實驗，並且仔細的回答我的問題，還有老師的博士生君璇，每每在我跟婉茹實驗過程有困惑時，提供寶貴的意見。感謝鄭雅文老師、藍先元所長、林慧茹醫師及我的指導老師們審閱論文，給予我寶貴的意見與指正，謝謝提供檢體進行研究的患者，讓這項研究得以完成。最後要謝謝我的家人在任何時刻給我支持與加油打氣。

羅育倫 謹誌記

中國醫藥大學 臨床醫學研究所

中華民國 99 年 6 月

目 錄	頁 次
中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
致謝 .....	V
目 錄 .....	VI
表目錄 .....	VII
圖目錄 .....	VIII
第一章 前言 .....	1
第一節 研究背景 .....	1
第二節 研究目的 .....	10
第二章 研究方法 .....	12
第一節 研究設計 .....	12
第二節 研究材料與研究方法 .....	12
第三節 統計方法 .....	18
第三章 研究結果 .....	19
第一節 描述性統計分析 .....	19
第二節 推論性統計分析 .....	21
第四章 討論 .....	23
第一節 結果討論 .....	23
第二節 研究限制 .....	25
第五章 結論與建議 .....	27
第一節 結論 .....	27
第二節 建議 .....	27
參考文獻 .....	28

表目錄	頁次
表一 眼翳及正常對照組之性別年齡分布 .....	35
表二 眼翳及正常對照組之 <i>CYP1A1 MspI</i> 基因多型性分布 .....	36
表三 眼翳及正常對照組之 <i>GSTM1</i> 基因多型性分布 .....	37
表四 <i>CYP1A1 MspI</i> 及 <i>GSTM1</i> 多型性各基因型之眼發生率 .....	38
表五 <i>CYP1A1</i> 及 <i>GSTM1</i> 多型性對眼翳危險因子的多元邏輯迴歸分析 .....	39





圖目錄	頁次
圖一 眼翳臨床外觀.....	40
圖二 <i>CYP1A1</i> PCR 引子與引子所放大的序列及 <i>MspI</i> 限制酶辨識位置.....	41
圖三 <i>CYP1A1</i> PCR 產物電泳結果 .....	42
圖四 <i>CYP1A1 MspI</i> PCR-RFLP 多型性的電泳膠圖結果與判讀.....	43
圖五 <i>GSTM1</i> PCR 產物的電泳膠圖結果及多型性表現判讀 .....	44



# 第一章 前言

## 第一節 研究背景

### 1.1.1 眼翳(ptyerygium)的臨床表徵及流行病學

眼翳或稱翼狀贅片是一種在結膜上往眼角膜不正常慢性增生的翼狀組織(圖一)，盛行率(prevalence)從 0.3%到 29%都有研究報告過[1, 2]。眼翳 pterygium 源於希臘字 pterygos，翼的意思，因為臨床外觀狀如翼(wing-shaped)，為隆起皺摺的結膜伴有纖維血管(fibrovascular)增生的慢性發炎組織，翼狀或三角尖端朝向眼角膜，會慢慢往眼角膜上生長，進而遮蔽視線或者造成散光影響視力[3]，眼翳本身因為發炎與不平整的特性也使得眼睛易有乾澀不適等症狀[4]，眼翳通常長在角膜邊輪部(limbus)的眼裂間(interpalpebral fissure)3 點及 9 點的位置，又以鼻側居多[5]。

### 1.1.2 眼翳發生的危險因子

眼翳的發生目前最被廣為接受的环境因素為紫外線照射，特別是紫外線 B，[5, 6]，流行病學的調查在赤道南北緯 37°間，紫外線暴露相對較高的地區，發現有較高的眼翳發生率，就好像有一個相對的眼翳盛行區帶”眼翳帶”(ptyerygium belt)一樣[7]，職業上，眼翳跟一些比較常在戶外工作與紫外線暴露的職業有關連

如畜牧工、牧場雜工、鋸木工、勞工以及電焊工等[8-10]，其他如乾燥環境、風沙等所造成的微創傷說[5, 11]以及與人類乳突病毒(human papilloma virus, HPV)感染相關也有人提出[12]，另外也有人提出不同的研究結果[13, 14]，但均不如紫外線暴露的傷害學說，有較廣泛一致的共識。

### 1.1.3 眼翳的病理組織學

組織學上，眼翳的上皮細胞會侵犯眼角膜並表現出鱗狀上皮化生(squamous metaplasia)以及杯狀細胞的增生(goblet cell hyperplasia)，眼翳的上皮細胞會侵犯眼角膜的 Bowman 氏層(Bowman's layer)，造成 Bowman 氏層的破壞，並且有大量異常彈性蛋白纖維(elastic fiber)的產生與沉積(elastodysplasia)以及退化(elastoid degeneration)[15]，另外，還有纖維母細胞(fibroblast)的增生與浸潤、淋巴球的浸潤[16]。

### 1.1.4 眼翳的發生假說

Coroneo 提出二階段眼翳病理發生的假說，認為眼翳的發生第一階段先是輪部角膜-結膜上皮屏蔽開始與持續的破壞，第二階段是角膜持續的結膜化(conjunctivalization)[17]。關於第一階段輪部角膜-結膜上皮屏蔽的破壞，有研究發現由於眼角膜聚光的光學特性，從眼顛側周邊來的光線因角膜弧度與前房深度的不同有機會聚焦於眼角膜鼻側的輪部，據估計此聚焦處的光強度約為入射處的

20 倍，或者可由顛側周邊穿過前房及鼻側水晶體的路徑，越過表淺上皮細胞的保護而直接由內照射到鼻側輪部較深的基底上皮細胞(basal epithelium) [5, 18, 19]，進而造成局部輪部角膜-結膜上皮屏蔽的破壞，先前有研究利用免疫組織染色法 (immunohistochemical stain)，發現在眼翳尖端於眼角膜 Bowman 氏層受侵犯處找到了變性的輪部幹細胞(limbal stem cell)[20]。第二階段是角膜持續的結膜化(conjunctivalization)，包括廣泛的細胞增生、發炎反應以及結締組織的重塑與血管新生等[16, 17]，這些特性以及眼翳在手術切除後經常復發[21]，治療時也常用到癌症藥物抗細胞分裂的 mitomycin c 處理[22, 23]，以及眼翳組織會局部侵犯眼角膜的 Bowman 氏層與淺層基質層等等特性，跟以往認為眼翳只是單純的退化性疾病[15, 24]有很大的不同。

#### 1.1.5 眼翳是一種增生性疾病

最近的研究指出，眼翳並不只是退化性疾病，更像增生性疾病(proliferative disorder)，*p53* gene 為腫瘤抑制基因(tumor suppressor gene)，調控細胞週期與複製並與許多腫瘤的發生有關[25]，利用免疫組織化學染色，可在眼翳上皮細胞[26, 27]以及輪部幹細胞中[28]，發現 *p53* 蛋白的表現，本實驗室利用 DNA 定序的方法在眼翳組織中發現 *p53* 腫瘤抑制基因的突變，51 個檢體中共有 15.7%有 *p53* 基因的突變且大部分為點突變[29]，另外，眼翳組織也發現比正常結膜有較廣泛的生長因子表現，包括鹼性纖維母細胞生長因子(basic fibroblast growth factor,

bFGF)，血小板衍生生長因子 (platelet derived growth factor, PDGF)，轉化生長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 以及細胞激素(cytokine): 腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) [30]，而 TNF- $\alpha$  可以促進血管新生與纖維母細胞膠原蛋白產生[31]，這些生長因子與細胞激素的表現，或許可以解釋眼翳形成第二階段的角膜持續的結膜化作用，也就是在疾病生成的過程中，經由這些生長因子與細胞激素的作用，廣泛的增加細胞增生、發炎反應以及結締組織的重塑與血管新生等作用[17]，在眼翳組織也發現有 Matrix metalloproteinases (MMPs) 及其專一性組織抑制因子(Tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)的表現，MMP 跟 TIMP 是參與胚胎發育[32]、血管新生[33]、傷口修復[34]以及腫瘤發生[35]等結締組織重塑的重要因子，在體外培養的眼翳上皮細胞實驗中，可發現 interleukin-1 及 TNF- $\alpha$  會增加 MMP-1 以及 TIMP-1 mRNA 與下游蛋白的表現[36]，而紫外線的暴露會引起眼表面前發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokine)的產生[37, 38]，這些研究提供了更進一步的證據支持眼翳是增生性疾病，而不是單純的退化性疾病[26, 39]。

### 1.1.6 眼翳研究的重要

台灣位屬亞熱帶地區，日照充足加上近年臭氧層破壞，使紫外線暴露與紫外線暴露相關疾病更受到重視[40]，眼翳是眼科常見與紫外線暴露相關的疾病且在手術後容易復發[41]，目前的治療方式包括手術切除與術中或術後投予抗細胞分裂藥物如 mitomycin-c 等來預防復發，不過 mitomycin-c 之使用曾有嚴重副作用

之報告[42]，根據世界衛生組織的 Vision 2020 計畫的精神要減少可避免的視力喪失眼睛疾病，眼翳雖未列入其 10 大目標疾病，但眼翳對視力的影響也是一種可避免的視力喪失疾病，目前對眼翳發生的確實病理機轉並不完全了解，眼翳除了對視力的影響外，由於眼翳與陽光相關皮膚傷害顯著關聯性的研究實証[43]，眼翳可能是日照增加的早期證明[5]，因此眼翳的研究與處理儼然成為一項重要的公共衛生問題[17]。

### 1.1.7 多環芳香烴化合物(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH)

多環芳香烴(PAH)是芳香族碳氫化合物的一種特例，由不包含雜環或取代基 2 個或 2 個以上緊鄰的芳香環所組成，多環芳香烴化合物是有機物不完全燃燒、氧化所產生如車輛廢氣、火力發電、垃圾燃燒、工業廢物、石油污染、吸煙甚至食物烹煮等等，並且普遍存在於環境中(國際癌症研究中心 IARC1983 年報告)。職業環境若長期暴露於 PAH，將導致肺癌或者其他癌症產生機會的提高，特別是在接觸到焦煤、瀝青、汽油等等物的職業。其中有很多是已知或潛在的致癌物質 [44]。

### 1.1.8 多環芳香烴化合物苯并(a)芘(Benzo(a)pyrene, BaP)與 BaP 的代謝

苯并(a)芘 (BaP) 是第一個被發現且最廣為研究的 PAH類化學致癌物質，台灣空氣中的懸浮微粒子被發現有較高含量的多環芳香烴，包括苯并(a)芘等[45,

46]，BaP的代謝酵素可分為第一期與第二期酵素(phase I and phase II enzyme)，為了將人體內的藥物或者有毒物質排出體外，先要將這些物質變成親水性或使極性增加，phase I的酵素即透過氧化(oxidation)、還原(reduction)、水解(hydrolysis)等方法進行，但在這個代謝過程有時反而產生更不穩定與易致癌的物質，phase II反應主要為接合反應(conjugation)，phase II酵素透過與在 phase I 反應所產生的極性功能基(polar functional groups)，將致癌化合物轉變成親水性的代謝物而排出體外，phase I 的酵素如：cytochrome p450 1A1, 2C9 及 3A4，phase II 的酵素如麩胺硫轉移酵素 (glutathione-S- transferase, GST) [47, 48](附錄 圖一)。

### 1.1.9 BaP 可造成 *p53* 基因的突變

BaP 及其代謝中間產物被發現會造成 *p53* 突變及導致肺癌，BaP 的代謝中間產物之一 BaP 7,8-diol 9,10-epoxide (BPDE)是一種極具活性的致癌物質，BPDE 會攻擊 *p53* 基因中的鳥糞嘌呤鹼基(guanine base)並形成 DNA 共價鍵結物 (DNA adducts: BPDE-N2-dG adduct)，原本應與胞嘧啶(cytosine)形成鹼基對的鳥糞嘌呤 ( $G \equiv C$ )，被修飾後變成與腺嘌呤(adenosine)配對( $G' = A$ )，在下一次的 DNA 複製中，胸腺嘧啶(thymine)再與 adenosine 配對( $T = A$ )，導致 *p53* ( $G \equiv C$ )  $\rightarrow$  ( $T = A$ )的點突變[49, 50]。

### 1.1.10 單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP) 簡介

在人類基因體(genome)遺傳訊息約 $3 \times 10^9$ 個鹼基序列中，超過99.9%以上的鹼基序列是完全相同的[51]，剩下的這些序列變異類型包含有插入(insertion)變異、刪除(deletion)變異、重複序列次數變異、單一鹼基變異等[52, 53]。重複序列次數變異例如短縱列重複序列(short tandem repeat, STR)及數目變異縱列重覆序列(variable number tandem repeat, VNTR)等[54]；單一鹼基變異是基因體中存在的最多的變異形式[55, 56]，當 DNA序列上的某一基因座(loci)具有兩種或者以上的對偶基因(allele)，且其存在族群中的比例(即對偶基因頻率(allele frequency))大於1%時，稱此基因座具有多型性(polymorphism)，此單一核苷酸長度的多型性稱為單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)[56]，可以發生在基因中任何位置，包含exon、intron、啟動子(promoter)及非編碼區(non-coding region)。

### 1.1.11 細胞色素 P450 1A1 基因(cytochrome P450 1A1, CYP1A1)多型性和其蛋白表現

*CYP1A1* 基因位於人體第 15 對染色體 15q24.1 的位置，屬於 phase I 的代謝活化酵素，是細胞代謝 BaP 的主要酵素，*CYP1A1* 會將 BaP 氧化成為環氧化物 exopside：BaP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE)以利接下來 phase II conjugation 反應，使其易溶於水並排出體外，但 BPDE 是一個極不穩定的中間物質，易與 DNA 鍵結形成 DNA adduct 而造成細胞的基因表現異常或甚至轉形癌化。



據 Landi, M.T 等報告, *CYP1A1* 基因於 *MspI* 限制酶辨識位置的 T→C 的多型性會造成 *CYP1A1* 酵素活性的增加[57], 使 BaP 氧化成高毒性 BPDE 的速度增加, 如果下游 phase II 酵素接合反應速度小於 phase I 酵素反應速度, 可能使高毒性中間產物 BPDE 累積時間加長, 讓 DNA 有較高機會接觸到 BPDE 形成共價鍵結 BPDE-like DNA adduct。 *CYP1A1* 基因於 *MspI* 限制酶辨識位置的 T→C 的多型性也會使口腔癌[58, 59]、大腸癌、乳癌及肺癌[60, 61]等的致癌率提高。

*CYP1A1 MspI* 多型性 (T6235C) 位於 3' 端不轉譯區 (3'untranslated region, 3'UTR), 屬於單核苷酸多型性中的非編碼單核苷酸多型性 (non-coding SNP), 然而為何此多型性會影響 *CYP1A1* 蛋白的表現, 並進一步引響 BPDE-like DNA 的含量? 3' 端不轉譯區為 DNA 序列轉譯終止密碼 (stop codon) 到最後轉錄中止 (transcription termination) 間的 DNA 序列, 包括多聚腺苷酸化訊號 (polyadenylation signal), 在基因構造中, 5' 端不轉譯區 (5'UTR) 經常包含基因表現的調控因子, 如 motifs, boxes, response or binding elements 等, 3' 端不轉譯區雖然沒有這些特別的基因表現調控因子, 但是卻也參予基因表現的調控, 3' 端不轉譯序列可以調控細胞核運輸 (nuclear export)、多聚腺苷酸化狀態 (polyadenylation status)、subcellular targeting, 甚至 mRNA 的轉譯或者分解速度 (rates of translation and degradation of mRNA), 又叫可稱為細胞質多聚腺苷酸化元素 (cytoplasmic polyadenylation elements) 或 腺苷酸化控制元素 (adenylation control elements)[62, 63], 許多半生期短的 mRNA, 常含有約 50 個核苷酸長, 富含腺嘌呤及尿嘧啶的序列在 3' 端不

轉譯區(AU rich element: AURE)，當改變或移除這樣的序列時，常常可使 mRNA 半生期加長。*CYP1A1 MspI* 即位於 3'端不轉譯區上 polyadenylation site 下游第 264 個鹼基處[64]，有些研究發現 *CYP1A1 MspI* 同型合子變異型(C/C)比起同型合子野生型(T/T)的蛋白活性是增加的，但卻與 mRNA 量無關[57]，推測認為 *CYP1A1 MspI* 的多型性可能經由影響 3'端不轉譯區中的 adenylation control elements 的功能，使 mRNA 半生期加長，使得 CYP1A1 酵素蛋白增加表現量，進一步使 PAH 中間代謝活性致癌物質增加[57, 65]，或者另外有研究發現 *CYP1A1 MspI* 多型性(T6235C)與 *CYP1A1* 第 7 exon 中，第 4889 位置腺嘌呤取代為鳥糞嘌呤(A4889G)的單核苷酸多型性有非常密切的連鎖(97%以上)，而第 4889 位置腺嘌呤取代為鳥糞嘌呤會使得 *CYP1A1* 胺基酸序列，在 HR2 區域第 462 個胺基酸由 Ile 轉變為 Val，進而影響酵素的活性，因此 *CYP1A1 MspI* 多型性所相關聯的 *CYP1A1* 蛋白活性改變可能是間接經由與此 nonsynonymous SNP 的緊密連鎖而造成而非本身直接導致蛋白結構的改變[57, 64]。

#### 1.1.12 *GSTM1* 基因多型性和其蛋白表現

麩胺硫轉移酵素(GST)為一包含許多功能主要在去細胞毒素、使細胞免於親電子物質攻擊的大族群酵素，GST mu 次族群則包含一段位於 1p13.3 長 100-kb 的基因聚落排列如下[66]： 5'-*GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3*-3'

*GSTM1* 是屬於 Phase II 之代謝酵素，參與 BaP 的代謝解毒路徑，已知

GST M1 的酵素活性亦受到基因多型性的影響。*GST M1* 的基因多型性主要由於整段基因缺失而使其失去活性，造成此一變異的原因是因為 *GST M1* 基因的 2 側各由一段長 4.2kb 幾乎相同的序列所包圍，*GST M1* 基因的缺失變異就是由此 2 相似的序列同源重組(homologous recombination) 所造成[66](附錄 圖二)

*GST M1* 多型性分成野生型(wild type)及不表現型(null type)兩種，不表現型會造成功能蛋白的不表現[67, 68]，因此 GST M1 的酵素活性受到基因多型性的影響。

在本實驗室之前的研究發現，約有 35% 的眼翳檢體呈 BPDE-like DNA adduct 免疫組織化學染色陽性(immunohistochemistry stain positive)，並且 DNA adduct 的量與其代謝酵素基因 *CYP1A1* 的多型性有顯著關連，形成 BPDE-like DNA adduct 的危險性，*CYP1A1* 變異型 (包含同型合子變異型 C/C 型及異型合子變異型 T/C 型)是野生型 T/T 型的 9.675 倍( $p=0.001$ , 95% Confidence Interval 2.451–38.185)[69]。

## 第二節 研究目的

眼翳的發生目前最被廣為接受的环境原因為紫外線照射[5, 6]，而較常於室外曝露於紫外線的人，也可能有較多的機會接觸空氣中的污染物質，關於污染物質在眼翳形成中所扮演角色的文獻探討非常少，台南國立成功大學的研究發現，

水受砷污染流行區居民的眼翳發生率比非水污染流行區的還高，並且水砷污染程度較嚴重者有較高的發生率[70]，提供眼翳形成除了紫外線外，其他環境污染因子的可能影響。由於 p53 蛋白以及 p53 基因突變在眼翳組織中的發現，而造成 p53 基因突變的確切原因目前仍不清楚，除紫外線外，環境污染物 BaP 已知會導致 p53 基因 G:C-T:A 的突變[71]，與肺癌等癌症的發生相關[49]，本實驗室之前的研究發現 33%(34/103)的眼翳檢體中有 BPDE-like DNA adduct 的存在[72]，而且其代謝酵素基因 *CYP1A1* 的多型性與 BPDE-like DNA adduct 的量有顯著關連[69]，因此推測除了紫外線外，環境中的污染物質 BaP 與其中間代謝物質 BPDE 也可能與眼翳的發生相關。

本研究的目的是在分析了解眼翳組織與正常對照組 BaP 代謝酵素 *CYP1A1* 及 *GSTM1* 的基因多型性與形成眼翳的關聯性，希望提供除了紫外線外，環境中的污染物質 BaP 也可能是造成眼翳發生的分子生物上進一步的証據。

## 第二章 研究方法

### 第一節 研究設計

本研究之實驗設計為一病例對照研究，共收集了 205 位眼翳開刀後病患的檢體，對照組收集了 206 位沒有罹患眼翳或者眼裂斑(pinguecula)患者的血液檢體當做對照組，此次的研究有經過人體試驗委員會通過，所有的病患都有簽署同意書。

### 第二節 研究材料與研究方法

#### 2.2.1 研究材料

##### 2.2.1.1 DNA 萃取

Sodium dodecyl sulfate(SDS)購自 UniRegion Bio-Tech, Ethylenedinitrilo, tetra-acetic, disodium salt(EDTA)及 sodium chloride (NaCl)購自台灣生工有限公司 (MDBio, Inc.), sodium hydroxide (NaOH)由默克公司代理，購自德國 Merck 公司, sodium acetate(NaOAc) 購自德國 Riedel-deHaen 公司， Phenol 購自台灣皓峰公司, chloroform 購自 chemical 公司, ethanol absolute 購自西班牙 Panreac Quimica 公司，DNA 萃取試劑 Genomarker reagent 購自台灣真興公司。

### 2.2.1.2 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)及限制酶長度基因多型性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

dNTP, PCR 10倍反應緩衝溶液(10× reaction buffer),及 Taq DNA polymerase 購自美國 MD Bio公司, 引子(primer)購自台北明欣生物科技有限公司(MB MISSION BIOTECH), *Msp I* 限制酶購自日本 TaKaRa-Bio公司。

### 2.2.2 檢體收集

本研究實驗組收集了於眼科接受眼翳切除手術後，經福馬林固定及石蠟包埋切片的檢體共 205 個，包括 136 個來自男性病患的檢體及 69 個來自女性病患的檢體，所有的眼翳檢體之前都未接受過手術治療，沒有包含手術後復發的病患在內，年齡分布從 52 歲到 85 歲，平均年齡 74.2 歲；對照組來自 206 位沒有罹患眼翳或者眼裂斑(pinguecula)患者的周邊血液檢體，來自 126 位男性及 80 位女性，平均年齡 62.0 歲(年齡分布從 55 到 85 歲)。

### 2.2.3 研究方法

#### 2.2.3.1 DNA 萃取

實驗組的 DNA由石蠟包埋的眼翳切片組織中萃取出來，將 DNA溶解緩衝液(DNA lysis buffer)加到從石蠟萃取出來置於玻片上的眼翳上皮組織，將組織完全水解，再將溶解後含 DNA的組織液吸取至1.5ml微量離心管(Eppendorf tube)

儲存，加入5  $\mu$ l 蛋白酶K (proteinase K) (10mg/ml)於56°C作用2小時，之後以傳統的phenol/chloroform 法除去蛋白質。首先加入500  $\mu$ l的酚/氯仿混合液 (phenol:chloroform = 25:24)充分混合使蛋白變性，因 DNA不會溶於酚或氯，且酚或氯比重比水大，以12,000 rpm離心15分鐘後，上面為水層下面為 phenol及 chloroform層，取上清水液再加入500 $\mu$ l chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 洗去殘餘之 phenol，充分混合後以12,000 rpm離心15分鐘分離 chloroform，取上清水溶液，再加入50  $\mu$ l 3M 醋酸鈉(NaOAc)(PH 5.2)中和 DNA上的負電荷及1 ml的 100%冰酒精，於-20°C 冰箱作用30分鐘，藉以將 DNA沉澱出，再以12,000 rpm離心20分鐘後小心倒掉上清液，並加入500  $\mu$ l 70% alcohol洗去殘留之鹽類，因 DNA不溶於70%酒精，鹽類會再被溶出，再以12,000 rpm離心20分鐘後倒掉上清液，並以真空抽乾殘餘的水分，所得之白色沉澱物即為 DNA。將沉澱出來之 DNA以無菌水(dd Water)溶解並以紫外線光譜儀測定 DNA在260 nm和280 nm的吸光值，其 $A_{260}/A_{280}$ 比值應在1.6到1.8之間。若比值小於1.6則表示蛋白含量過高，應再以 proteinase K處理後重複上述萃取步驟；若比值大於1.8則表示 RNA含量過高，則應再以 RNase 處理後重複上述萃取步驟。DNA的濃度以下列的公式計算： $\text{DNA} (\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數}$ 。DNA萃取完成後，溶成濃度為1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  置於-80°C 冰箱保存，以用於 DNA基因多型性之分析用。

### 2.2.3.2 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction)

聚合酶連鎖反應所用的材料包括: 欲放大的檢體 DNA 1 $\mu$ l當模板, 0.5 mM dNTP, 5  $\mu$ l 10 $\times$  reaction buffer, 2.5 U Taq polymerase 及 0.5 mM 引子。

第一步先在94  $^{\circ}$ C加熱5分鐘，接著是35個循環反覆於以下步驟:

Denaturing: 94  $^{\circ}$ C 30秒，打斷鹼基對間的氫鍵使分離為單股 DNA

Priming: 60  $^{\circ}$ C 45秒，降溫至60  $^{\circ}$ C 使引子能夠黏上單股 DNA，提供

3'OH端讓DNA聚合酶能開始合成 DNA

Extension: 72  $^{\circ}$ C 1分鐘，此為 Taq DNA聚合酶反應最適之溫度，加快

DNA聚合酶合成DNA的速度

最後以72  $^{\circ}$ C 6分鐘做最後一次的 extension反應時間。

### 2.2.3.3 *CYP1A1* 基因多型性之分析

*CYP1A1* 基因多型性之分析是利用 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)方法，將所得之 PCR 產物取 12.5  $\mu$ l，10x reaction buffer 1.5  $\mu$ l 及限制酵素 1  $\mu$ l 於 37 $^{\circ}$ C 反應 4 小時，以 1.5 % agarose 膠體進行電泳分析，引子序列及限制酶之使用如下列所示[58]：

*CYP1A1*：

S 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'

AS 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3'



限制酶：*Msp I*

所設計的引子將放大*CYP1A1*第266個鹼基至第605個鹼基，為一段340bp長的片段產物，而限制酶：*Msp I*所辨識的序列為一CCGG的雙股反向重複序列(reverse palindrome)，*Msp I*會切在CC之間，*CYP1A1*基因上第400個鹼基在野生型(wild type)為T鹼基，在變異型則有C鹼基(包含同型合子C/C及異型合子T/C)(T6235C)，會使得原本CTGG的序列變成CCGG序列，且為*CYP1A1*上唯一的一段CCGG序列，使得*Msp I*限制酶會將變異型DNA序列切成2段，一段長206bp，另一段長134bp(圖二)。



因此限制酶 *Msp I* 多型性的結果判讀如下所示：

同型合子野生型 homozygous wild type(T/T): 340 bp 長的產物

異型合子變異型 heterozygous (T/C) : 340 bp, 206 bp, 134 bp 長的產物

同型合子變異型 homozygous mutant type (C/C): 206 bp, 134 bp 長的產物

#### 2.2.3.4 *GST M1* 基因多型性之分析

*GST Mu1* gene 是一個約 11kb 長的 gene，常見的基因型變異是整段 *GST M1* 基因缺失的變異，形成所謂的 *GST M1* 不表現型基因型，一篇統合分析的研究 [73](meta-analysis)分析了 30 個各別研究，發現高加索人有高達 53%是這種 *GST M1* 不表現型基因型，亞洲人的比例也相似。造成此一變異的原因是因為 *GST*

*MI* 基因的 2 側各由一段長 4.2kb 幾乎相同的序列所包圍，*GSTM1* 基因的缺失變異就是由此 2 相似的序列同源重組(homologous recombination) 所造成[66](圖一)。因所設計出來的專一性引子是用來放大 *GSTM1* 序列內一段 165bp 長的片段，所以 PCR 產物有 2 種結果，一是檢體 DNA 序列沒有缺失性變異，可以放大出標的片段 165bp，此即為表現型基因型(present type)；另一種是檢體 *GSTM1* DNA 序缺失性變異，無引子可辨識序列，沒有 PCR 產物，此即為 *GSTM1* 不表現型基因型。在 PCR 後，如果沒有產物片段，為了避免是因為 PCR 失敗，沒有放大出產物片段而非真正的 *GSTM1* 不表現型基因型，將沒有產生 PCR 產物的檢體 DNA 重複 PCR 反應，除了原本的 *GSTM1* 引子外，再加入一組  $\beta$ -actin (*ACTB*) 的引子，以確認  $\beta$ -actin 有被 PCR 放大，PCR 反應成功，*GSTM1* 沒有產物是不表現型基因型所產生。

*GSTM1* PCR反應條件如下：

100 ng DNA, 0.5 mM dNTP, 5  $\mu$ l PCR10 $\times$ reaction buffer, 2.5U Taq polymerase及0.5 mM 引子，可參考Groppi, A.等之文獻[74]。將所得之PCR產物以2% agarose膠體電泳進行結果分析，引子序列如下列所示：

*GSTM1*：

S 5'-GAAGGTGGCCTCTCCTTGG-3'

AS 5'-AATTCTGGATTGTAGCAGAT-3'

結果之判讀如下所示：

表現型 wild type: 165 bp product 長的產物

不表現型 null type: 無 PCR 產物

### 第三節 統計方法

本論文使用的統計方法有

1. 皮爾森卡方檢定(Pearson chi-square test)：用於實驗組與對照組間基因型分布是否有差異，當任一欄位出現頻率次數小於五時，改以費雪爾正確概率計算 Fisher's exact test 來統計。
2. 二元迴歸分析(Binary logistic regression test) 用於比較各變異型相對於野生型發生眼翳的勝算比(Odds Ratio)以及 95%信賴區間(confidence interval)，是否有統計上差異。
3. 多元迴歸分析(Multiple logistic regression test)用於計算調整 *CYP1A1 MspI* 及 *GSTM1* 兩基因多型性間彼此影響後的勝算比(Odds Ratio)以及 95%信賴區間(confidence interval)。

## 第三章 研究結果

### 第一節 描述性統計分析

實驗組總共收集了 205 位眼翳開刀後病患的檢體，其中包含 136 位男性及 69 位女性，平均年齡 74.2 歲(年齡分布從 52 到 85 歲)；對照組收集了 206 位沒有罹患眼翳或者眼裂斑(pinguecula)患者的血液檢體當做對照組，包括 126 位男性及 80 位女性，平均年齡 62.0 歲(年齡分布從 55 到 75 歲)，實驗組及對照組不論在性別或者年齡上，都沒有統計上顯著的差異(表一)

#### 3.1.1 *CYP1A1* 基因多型性表現

##### 3.1.1.1 *CYP1A1* 的 PCR 產物

*CYP1A1* T6235C(rs4646903)以參考文獻設計出來的專一性引子進行 PCR 放大標的片段後，經膠體電泳分析確認有專一長度的產物片段並符合預期的 340bp 長，此 PCR 產物長度由 NCBI 網站上引子查詢及參考其他文獻記載得知[58, 64, 75]，PCR 產物片段長為 340 bp。總共 205 個眼翳檢體及 206 個對照組血液檢體皆可獲得專一長度的 PCR 產物片段，並符合預期的 340bp 長(圖三)

##### 3.1.1.2 *CYP1A1* *MspI* PCR-RFLP 多型性的判讀與結果

*CYP1A1*基因上T6235C的多型性，使得以 *MspI* 限制酶處理後產生長短不同

的基因片段，MspI 限制酶辨識的序列為CCGG，遇到這樣的序列會從CC間將DNA序列切斷，所以如果基因型為同型合子野生型T/T型，其序列為CTGG，不會被限制酶切斷，呈現的產物是 PCR產物的原片段長即340個bp；如果基因型是同型合子變異型C/C型，其序列為CCGG，會被限制酶切成2段，呈現的產物有兩種片段長度，即206 bp及134 bp 2種片段長度；若為異型合子變異型T/C型，則340 bp，206bp及134 bp 3種片段長度都有(圖四)。

分析實驗組205個眼翳檢體及對照組206個周邊血液檢體，結果發現眼翳組共有68個檢體(33.2%)是T/T型的同型合子野生型(homozygous wild type)，有29個檢體(14.1%)是C/C型的同型合子變異型(homozygous mutant type)，有108個檢體(52.7%)是T/C型的異型合子變異型(heterozygous mutant type)；對照組則有89個檢體(43.2%)是T/T型的同型合子野生型，有14個檢體(6.8%)是C/C型的同型合子變異，有103個檢體(50.0%)是T/C型的異型合子變異型。兩組的分布有統計上顯著的差異(p值=0.017)(表二)。

### 3.1.2 *GSTM1* 的 PCR 產物及多型性表現判讀

*GSTM1* gene是一個約11kb長的 gene，所設計出來的專一性引子是用來放大 *GSTM1*序列內一段165 bp長的片段，所以 PCR產物有2種結果，一是檢體DNA序列沒有缺失性變異，可以放大出標的片段165bp，此即為 present 基因型；另一種是檢體 *GSTM1* DNA序缺失性變異，無引子可辨識序列，沒有 PCR產

物，此即為*GSTM1*不表現型基因型(圖五)。

分析實驗組 205 個眼翳檢體及對照組 206 個周邊血液檢體，結果發現眼翳組共有 83 個檢體(40.5%)是不表現型基因型，有 122 個檢體(59.5%)是 present genotype; 對照組則有 84 個檢體(40.8%)是不表現型基因型，有 122 個檢體(59.2%)是 present genotype。翳狀贅肉與對照組兩組的分布並沒有統計上顯著的差異( $p$ 值=0.952)(表三)。

## 第二節 推論性統計分析

### 3.2.1 *CYP1A1 MspI*的基因多型性是眼翳的危險因子

知道 *CYP1A1 MspI*位置基因多型性的分布在眼翳組及對照組之間有顯著統計上的意義，為了進一步確切了解是各個基因型與發生眼翳危險性的關係，使用 Chi-square test 計算各 *CYP1A1 MspI*多型性基因型相對於 *CYP1A1 MspI* T/T 同型合子野生型基因型獲得眼翳的勝算比(Odds ratio)，結果發現，*CYP1A1 MspI* T/C 異型合子基因型的 odds ratio 是 1.372 (95%信賴區間 confidence interval = 0.906-2.079,  $p=0.135$ )；*CYP1A1 MspI* C/C 同型合子基因型的 odds ratio 是 2.711 (95% confidence interval = 1.331- 5.524,  $p=0.005$ ) (表四)。

### 3.2.2 *GSTM1*的基因多型性不是眼翳的顯著危險因子

使用 Chi-square test 計算 *GSTM1* 不表現型基因型相對於 *GSTM1* present type 野生型基因型獲得眼翳的勝算比(Odds ratio)，結果發現，*GSTM1* 不表現型基因型的 odds ratio 是 1.012 (95% confidence interval = 0.683 – 1.500,  $p = 0.950$ )，沒有統計上顯著的差異。

進一步利用 multiple logistic regression 分析調整去除 *GSTM1* 多型性對 *CYP1A1* *MspI* 成為眼翳危險因子的影響，發現調整後變異型基因型(包括 homozygous mutant type C/C 型及 heterozygous mutant type T/C 型)是野生基因型 T/T 型的 1.533 倍(95% 信賴區間: 1.027-2.29,  $p=0.037$ ) (表五)



## 第四章 討論

### 第一節 結果討論

本研究分析比較了眼翳組織與正常對照組 PAH 代謝酵素 *CYP1A1 MspI* 及 *GSTM1* 的基因多型性，結果發現 *CYP1A1 MspI* 基因多型性與眼翳發生有顯著的關聯，回顧文獻得知，這是第一個分析 *CYP1A1 MspI* 及 *GSTM1* 基因多型性與眼翳形成間關聯性的研究，本實驗室之前的研究發現眼翳有 BPDE-like DNA adduct[72]，而且其代謝酵素基因 *CYP1A1 MspI* 的多型性與所發現 BPDE-like DNA adduct 的量相關連[69]，因此推測除了紫外線外，環境中的污染物質暴露也可能是造成眼翳的原因。

之前多個研究顯示 DNA adduct 的含量與 *CYP1A1* 與 *GSTM1* 的多型性有關 [76, 77]，然而本實驗室之前的研究卻發現眼翳組織中 BPDE-like DNA adduct 的量只與 *CYP1A1 MspI* 的多型性有顯著相關，而與 *GSTM1* 沒有顯著相關[72]，與本研究的發現相符合：*CYP1A1 MspI* 基因多型性與眼翳的發生有顯著相關，*GSTM1* 則沒有相關。

GST 是抗氧化酵素的一員，與其他抗氧化酵素一起保護身體免於活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 的攻擊[78, 79]，*GSTM1* 不表現型基因型被報告與皮膚的光敏感有關聯[80, 81]，所以 *GSTM1* 不表現型基因型可能與眼角膜輪部 (limbus) 細胞光敏感有關，然而本實驗室的研究卻發現 *GSTM1* 與眼翳的發生率



無關，推論可能原因一：GST M1 酵素活性沒有改變，才對 PAH(BaP)的代謝沒有影響，也跟眼翳狀贅肉發生無關，然而 *GSTM1* null type 多型性為一整段 *GSTM1*基因的缺失，會造成功能蛋白的不表現，故會影響酵素活性改變。進一步推論可能原因二：GST M1酵素活性確實有下降，可是卻仍與 BPDE-like DNA adduct量及眼翳發生無關：可能有其他 phaseII enzyme參予 BPDE的代謝[82]，或其他代謝路徑如經 solvolysis作用成 tetraols[83, 84]或經 NADPH還原為 triols[85]。或者三：BPDE-DNA adduct產生了但被修復了，DNA adduct的量同時受 DNA修復基因的影響，使得 *GSTM1*的影響被抵消了，有研究比較癌症患者與健康對照組周邊血液淋巴球內 BPDE-DNA adduct的移除能力，發現癌症患者明顯低於對照組[86, 87]，也已經有研究發現 DNA修復基因的多型性會影響 DNA修復蛋白的修復力[88-90]，在本實驗室之前的研究發現 DNA修復基因的多型性與眼翳的產生有關[91]，因此推論可能 DNA修復基因的多型性與 BPDE DNA adduct的產生量有關。推論可能原因四：*GSTM1*不表現型基因型與早發性眼翳有關，與晚發性眼翳無關，本實驗室之前的研究發現 *GSTM1*不表現型基因型與60歲以前發生的眼翳有關，與晚發性(大於60歲)眼翳無關[92]，由於本研究所包含的眼翳病患平均年齡74.2歲(年齡分布52到85歲)，幾乎都屬於晚發性的眼翳，所以本研究沒有發現 *GSTM1*多型性與眼翳產生的關聯與之前的研究結果相符，然而為何 *GSTM1*基因的多型性只與早發性眼翳有關聯而與晚發性眼翳無關則有待進一步的研究。

BaP是目前最廣為人知與研究的多環芳香烴化合物之一，BaP已知會導致*p53*基因G:C-T:A 的點突變[71]，也是抽菸導致肺癌的主要突變方式[49]，本實驗室之前的研究也發現 BPDE-like DNA adduct的量在眼翳組織中與*CYP1A1*基因的多型性有關[69]，並且可能對眼翳組織中 *p53*的突變有關聯的傾向(未達統計上顯著的意義)[72]，本研究進一步發現 *CYP1A1 MspI* mutant type變異型(包含C/C與T/C)發生眼翳的危險性是野生型(T/T)的1.533倍，因此推論 *CYP1A1 MspI*基因多型性可能導致 BPDE DNA adduct的累積量增高而導致眼翳的發生。

## 第二節 研究限制

本研究分析比較了眼翳組織與正常對照組 PAH 代謝酵素 *CYP1A1 MspI* 及 *GSTM1* 的基因多型性，雖然發現了 *CYP1A1 MspI* 基因多型性是產生眼翳的危險因子，然而詳細的作用機轉仍不清楚，有待更進一步的研究與探討。

關於流行病學，目前對於眼翳的發生與 BaP 或 BPDE-like DNA adduct 等關聯的研究目前尚未有其他實驗室的資料，本實驗室之前的研究發現在高達 33%(34/103)的眼翳組織有 BPDE-like DNA adduct 免疫染色陽性，並且 BPDE-like DNA adduct 免疫染色陽性率與 *CYP1A1 MspI* 多型性有顯著相關，不過沒有對照組 BPDE-like DNA adduct 免疫染色陽性率來比較分析，本研究進一步比較眼翳患者組織與非眼翳患者對照組 *CYP1A1 MspI* 及 *GSTM1* 多型性的差別，因為對照組使用檢體為周邊血液，也無法進一步比較眼翳與正常結膜組織 BPDE-like

DNA adduct 量的差別。

也有研究顯示，BaP 的代謝與 BPDE 的產生並不只單純經由 CYPs/GSTs 這個傳統路徑產生，還有其他的代謝路徑也可以參予 BP-7,8-diol 的活化，如脂氧化酶(lipoxygenase)、脂質過氧化產物(lipid peroxidation products)、過氧化酶 peroxidase-dependent pathways[93, 94]、COX-1 及 COX-2[95]等，而這些其他路徑代謝酶的影響也有待進一步的研究。



## 第五章 結論與建議

### 第一節 結論

本實驗室之前的研究發現眼翳有 BPDE-like DNA adduct[72]，而且其代謝酵素 *CYP1A1 MspI* 的多型性與所發現 BPDE-like DNA adduct 的量相關連[69]，本研究則進一步發現 *CYP1A1 MspI* 的基因多型性與眼翳的發生有顯著相關，這個發現可以讓我們進一步推測眼翳形成的可能致病分子機轉：眼翳除了由廣為所知的紫外線引起外，環境中的污染物質暴露也可能是造成眼翳的原因。

### 第二節 建議

本研究分析比較了眼翳組織與正常對照組 PAH 代謝酵素 *CYP1A1 MspI* 及 *GSTM1* 的基因多型性，發現了 *CYP1A1 MspI* 基因多型性是產生眼翳的危險因子，然而詳細的作用機轉仍不清楚，可先收集分析正常結膜與眼翳組織 BPDE-like DNA adduct 量的差異，或利用體外培養方式培養眼翳及正常結膜上皮細胞，給予 BaP 處理，分析其 BPDE-like DNA adduct 量的差異，分析 *p53* 突變之情形、比較眼翳及正常結膜上皮細胞間 *CYP1A1* mRNA 量及蛋白質量、活性的異同等等，或可對 *CYP1A1 MspI* 基因多型性與眼翳形成間的機制有進一步的瞭解。

## 參考文獻

1. Verlee, D.L., *Ophthalmic survey in the Solomon Islands*. Am J Ophthalmol, 1968. **66**(2): p. 304-19.
2. Taylor, H.R., et al., *The long-term effects of visible light on the eye*. Arch Ophthalmol, 1992. **110**(1): p. 99-104.
3. Lin, A. and G. Stern, *Correlation Between Pterygium Size and Induced Corneal Astigmatism*. Cornea, 1998. **17**(1): p. 28.
4. Rajiv, S. Mithal, and A.K. Sood, *Pterygium and dry eye--a clinical correlation*. Indian J Ophthalmol, 1991. **39**(1): p. 15-6.
5. Coroneo, M.T., *Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis*. British Journal of Ophthalmology, 1993. **77**: p. 734-739.
6. Taylor, H.R., et al., *Corneal changes associated with chronic UV irradiation*. Arch Ophthalmol, 1989. **107**(10): p. 1481-4.
7. Moran, D.J. and F.C. Hollows, *Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation*. Br J Ophthalmol, 1984. **68**(5): p. 343-6.
8. Karai, I. and S. Horiguchi, *Pterygium in welders*. Br J Ophthalmol, 1984. **68**(5): p. 347-9.
9. Taylor, H.R., *Climatic droplet keratopathy and pterygium*. Aust J Ophthalmol, 1981. **9**(3): p. 199-206.
10. Norn, M. and C. Franck, *Long-term changes in the outer part of the eye in welders. Prevalence of spheroid degeneration, pinguecula, pterygium, and corneal cicatrices*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1991. **69**(3): p. 382-6.
11. Goldberg, L. and R. David, *Pterygium and its relationship to the dry eye in the Bantu*. Br J Ophthalmol, 1976. **60**(10): p. 720-1.
12. Varinli, S., et al., *Human papillomavirus in pterygium*. Cent Afr J Med, 1994. **40**(1): p. 24-6.
13. Chen, K.H., et al., *Lack of human papillomavirus in pterygium of Chinese patients from Taiwan*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(8): p. 1046-8.
14. Sjo, N.C., et al., *Human papillomavirus and pterygium. Is the virus a risk factor?* Br J Ophthalmol, 2007. **91**(8): p. 1016-8.
15. Austin, P., F.A. Jakobiec, and T. Iwamoto, *Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula*. Ophthalmology, 1983. **90**(1): p. 96-109.
16. Cameron, M.E., *Histology of pterygium: an electron microscopic study*. Br J Ophthalmol, 1983. **67**(9): p. 604-8.

17. Coroneo, M.T., N. Di Girolamo, and D. Wakefield, *The pathogenesis of pterygia*. *Curr Opin Ophthalmol*, 1999. **10**(4): p. 282-8.
18. Maloof, A.J., A. Ho, and M.T. Coroneo, *Influence of corneal shape on limbal light focusing*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. **35**(5): p. 2592-8.
19. Coroneo, M.T., N.W. Muller-Stolzenburg, and A. Ho, *Peripheral light focusing by the anterior eye and the ophthalmohelioses*. *Ophthalmic Surg*, 1991. **22**(12): p. 705-11.
20. Dushku, N. and T.W. Reid, *Immunohistochemical evidence that human pterygia originate from an invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells*. *Current Eye Research*, 1994. **13**(7): p. 473 - 481.
21. Sanchez-Thorin, J.C., G. Rocha, and J.B. Yelin, *Meta-analysis on the recurrence rates after bare sclera resection with and without mitomycin C use and conjunctival autograft placement in surgery for primary pterygium*. *Br J Ophthalmol*, 1998. **82**(6): p. 661-5.
22. Mastropasqua, L., et al., *Long term results of intraoperative mitomycin C in the treatment of recurrent pterygium*. *Br J Ophthalmol*, 1996. **80**(4): p. 288-91.
23. Lam, D.S., et al., *Intraoperative mitomycin C to prevent recurrence of pterygium after excision: a 30-month follow-up study*. *Ophthalmology*, 1998. **105**(5): p. 901-4; discussion 904-5.
24. Jaros, P.A. and V.P. DeLuise, *Pingueculae and pterygia*. *Survey of Ophthalmology*, 1988. **33**(1): p. 41-49.
25. Greenblatt, M.S., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. *Cancer Res*, 1994. **54**(18): p. 4855-78.
26. Tan, D.T., et al., *Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium*. *Am J Ophthalmol*, 1997. **123**(3): p. 404-5.
27. Weinstein, O., et al., *Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia*. *Eye (Lond)*, 2002. **16**(5): p. 619-21.
28. Dushku, N. and T.W. Reid, *P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors*. *Curr Eye Res*, 1997. **16**(12): p. 1179-92.
29. Tsai, Y.Y., et al., *P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium*. *Mol Vis*, 2005. **11**: p. 50-5.
30. Kria, L., A. Ohira, and T. Amemiya, *Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium*. *Acta Histochem*, 1996. **98**(2): p. 195-201.

31. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(12): p. 4167-4171.
32. Shimonovitz, S., et al., *Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **171**(3): p. 832-8.
33. Marsha, A.M., *The Regulation of Neovascularization by Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors*. Stem Cells, 1997. **15**(3): p. 180-189.
34. Fini, M.E., et al., *Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury*. Am J Pathol, 1996. **149**(4): p. 1287-302.
35. Onisto, M., et al., *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Phenotyping of Metalloproteinases and Inhibitors Involved in Tumor Matrix Invasion*. Diagnostic Molecular Pathology, 1993. **2**(2): p. 74-80.
36. Di Girolamo, N., et al., *Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(3): p. 671-9.
37. Kennedy, M., et al., *Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(12): p. 2483-91.
38. Di Girolamo, N., et al., *UVB-mediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(11): p. 3430-7.
39. Di Girolamo, N., et al., *Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases*. Prog Retin Eye Res, 2004. **23**(2): p. 195-228.
40. Norval, M., et al., *The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change*. Photochem Photobiol Sci, 2007. **6**(3): p. 232-51.
41. Ang, L.P., J.L. Chua, and D.T. Tan, *Current concepts and techniques in pterygium treatment*. Curr Opin Ophthalmol, 2007. **18**(4): p. 308-13.
42. Rubinfeld, R.S., et al., *Serious complications of topical mitomycin-C after pterygium surgery*. Ophthalmology, 1992. **99**(11): p. 1647-54.
43. Panchapakesan, J., F. Hourihan, and P. Mitchell, *Prevalence of pterygium and pinguecula: the Blue Mountains Eye Study*. Aust N Z J Ophthalmol, 1998. **26 Suppl 1**: p. S2-5.
44. Fetzer, J.C., *THE CHEMISTRY AND ANALYSIS OF LARGE PAHs*. Polycyclic Aromatic Compounds, 2007. **27**(2): p. 143 - 162.

45. Kuo, C.Y., et al., *Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan*. Environ Res, 1998. **78**(1): p. 43-9.
46. Lee, H., et al., *Correlation between meteorological conditions and mutagenicity of airborne particulate samples in a tropical monsoon climate area from Kaohsiung City, Taiwan*. Environ Mol Mutagen, 1994. **23**(3): p. 200-7.
47. Pelkonen, O. and D.W. Nebert, *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis*. Pharmacol Rev, 1982. **34**(2): p. 189-222.
48. Spivack, S.D., et al., *Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(16 Pt 1): p. 6002-11.
49. Denissenko, M.F., et al., *Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53*. Science, 1996. **274**(5286): p. 430-2.
50. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
51. Przeworski, M., R.R. Hudson, and A. Di Rienzo, *Adjusting the focus on human variation*. Trends in Genetics, 2000. **16**(7): p. 296-302.
52. Wright, A.F., *Nature Encyclopedia of the Human Genome 2*. 2003. p. 959-968.
53. Feuk, L., A.R. Carson, and S.W. Scherer, *Structural variation in the human genome*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(2): p. 85-97.
54. Freeman, J.L., et al., *Copy number variation: new insights in genome diversity*. Genome Res, 2006. **16**(8): p. 949-61.
55. Collins, F.S., L.D. Brooks, and A. Chakravarti, *A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation*. Genome Research, 1998. **8**(12): p. 1229-1231.
56. Brookes, A.J., *The essence of SNPs*. Gene, 1999. **234**(2): p. 177-186.
57. Landi, M.T., et al., *Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans*. Pharmacogenetics and Genomics, 1994. **4**(5): p. 242-246.
58. Kao, S.Y., et al., *Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 and susceptibility to oral squamous cell carcinoma and oral precancer lesions associated with smoking/betel use*. J Oral Pathol Med, 2002. **31**(9): p. 505-11.
59. Bartsch, H., et al., *Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(1): p. 3-28.
60. Hayashi, S., J. Watanabe, and K. Kawajiri, *High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class*



- glutathione S-transferase genes*. Jpn J Cancer Res, 1992. **83**(8): p. 866-70.
61. Kawajiri, K., et al., *Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene*. FEBS Lett, 1990. **263**(1): p. 131-3.
  62. Decker, C.J. and R. Parker, *Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts*. Current Opinion in Cell Biology, 1995. **7**(3): p. 386-392.
  63. Pesole, G., et al., *Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions*. Gene, 2001. **276**(1-2): p. 73-81.
  64. Hayashi, S.-i., et al., *Genetic Linkage of Lung Cancer-Associated MspI Polymorphisms with Amino Acid Replacement in the Heme Binding Region of the Human Cytochrome P450IA1 Gene*. J Biochem, 1991. **110**(3): p. 407-411.
  65. Dialyna, I.A., et al., *Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk*. Oncol Rep, 2003. **10**(6): p. 1829-35.
  66. Xu, S.-j., et al., *Characterization of the Human Class Mu Glutathione S-Transferase Gene Cluster and the GSTM1 Deletion*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(6): p. 3517-3527.
  67. Pemble, S., et al., *Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism*. Biochem J, 1994. **300** ( Pt 1): p. 271-6.
  68. Seidegard, J., et al., *Isoenzyme(S) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study*. Carcinogenesis, 1990. **11**(1): p. 33-36.
  69. Jai-Nien Tung, et al., *An association between BPDE-like DNA adduct levels and CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in pterygium* Molecular Vision, 2010. **16**: p. 623-629.
  70. Lin, W., et al., *Associations between Arsenic in Drinking Water and Pterygium in Southwestern Taiwan*. **Environ Health Perspect**, 2008. **116**(7).
  71. Hainaut, P. and K. Vahakangas, *p53 as a sensor of carcinogenic exposures: mechanisms of p53 protein induction and lessons from p53 gene mutations*. Pathol Biol (Paris), 1997. **45**(10): p. 833-44.
  72. Lai, T.J., et al., *An association between BPDE-like DNA adduct levels and P53 gene mutation in pterygium*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 1687-91.
  73. Garte, S., et al., *Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2001. **10**(12): p. 1239-1248.
  74. Groppi, A., et al., *Glutathione S-transferase class mu in French alcoholic cirrhotic patients*. Hum Genet, 1991. **87**(5): p. 628-30.

75. Yeh, C.-C., et al., *Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, cigarette smoking and risk of coronary artery disease*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2009. **667**(1-2): p. 77-81.
76. Lodovici, M., et al., *Benzo(a)pyrene Diol-epoxide (BPDE)-DNA Adduct Levels in Leukocytes of Smokers in Relation to Polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2004. **13**(8): p. 1342-1348.
77. Alexandrov, K., et al., *CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation*. Carcinogenesis, 2002. **23**(12): p. 1969-1977.
78. Kerb, R., et al., *Deficiency of Glutathione S-Transferases T1 and M1 as Heritable Factors of Increased Cutaneous UV Sensitivity*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(2): p. 229-232.
79. Halliwell B, G.J.e., *Antioxidant defences*. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.
80. Strange, R.C., J.T. Lear, and A.A. Fryer, *Polymorphism in glutathione S-transferase loci as a risk factor for common cancers*. Arch Toxicol Suppl, 1998. **20**: p. 419-28.
81. Ollier, W., et al., *Association of homozygosity for glutathione-S-transferase GSTM1 null alleles with the Ro+/La- autoantibody profile in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(10): p. 1763-4.
82. Amos, C.I., N.E. Caporaso, and A. Weston, *Host factors in lung cancer risk: a review of interdisciplinary studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1992. **1**(6): p. 505-13.
83. Thakker, D.R., et al., *Metabolic formation of 1,9,10-trihydroxy-9,10-dihydro-3-methylcholanthrene: a potential proximate carcinogen from 3-methylcholanthrene*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(2): p. 645-647.
84. Yang, S.K., D.W. McCourt, and H.V. Gelboin, *The mechanism of hydrolysis of the non-K-region benzo[a]pyrene diol epoxide r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(15): p. 5130-5134.
85. Yang, S.K. and H.V. Gelboin, *Nonenzymatic reduction of benzo(a)pyrene diol-epoxides to trihydroxypentahydrobenzo(a)pyrenes by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*. Cancer Res, 1976. **36**(11 Pt 1): p. 4185-9.
86. Wei Q, et al., *Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients*. Cancer Res., 1996. **56**(18): p. 4103-7.

87. Cheng L, et al., *Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1998. **7**(6): p. 465-8.
88. Wu, X., et al., *XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(3): p. 505-509.
89. Benhamou, S. and A. Sarasin, *ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk*. *Mutagenesis*, 2002. **17**(6): p. 463-469.
90. Chunying, L., E.W. Li, and W. Qingyi, *DNA repair phenotype and cancer susceptibility? mini review*. *International Journal of Cancer*, 2009. **124**(5): p. 999-1007.
91. Tsai, Y.Y., et al., *Pterygium and genetic polymorphism of DNA double strand break repair gene Ku70*. *Mol Vis*, 2007. **13**: p. 1436-40.
92. Tsai, Y.Y., et al., *Null type of glutathione S-transferase M1 polymorphism is associated with early onset pterygium*. *Mol Vis*, 2004. **10**: p. 458-61.
93. Marnett, L.J., *Prostaglandin synthase-mediated metabolism of carcinogens and a potential role for peroxy radicals as reactive intermediates*. *Environ Health Perspect*, 1990. **88**: p. 5-12.
94. Trush, M.A. and T.W. Kensler, *An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991. **10**(3-4): p. 201-209.
95. Wiese, F.W., P.A. Thompson, and F.F. Kadlubar, *Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(1): p. 5-10.

表一 眼翳及正常對照組之性別年齡分布

	眼翳	對照組(血液)
男性	136	126
女性	69	80
總數	205	206
年齡	74.2 (52-85)	62.0(55-75)



表二

眼翳及正常對照組之 *CYP1A1 MspI* 基因多型性分布

Genotype	Pterygium (n=205)	Control (n=206)	<i>p</i> -value
T/T	68 (33.2%)	89 (43.2%)	
T/C	108 (52.7%)	103 (50.0%)	
C/C	29 (14.1%)	14 (6.8%)	0.017

Pearson's chi-square test



表三

眼翳及正常對照組之 *GSTM1* 基因多型性分布

Genotype	Pterygium (n=205)	Control (n=206)	<i>p</i> -value
Present	83(40.5%)	84(40.8%)	0.952
Null	122(59.5%)	122(59.2%)	

Pearson's chi-square test



表四

*CYP1A1 MspI* 及 *GST M1* 多型性各基因型  
之眼翳發生率

	OR	95%CI	<i>p</i> -value
<b><i>CYP1A1</i></b>			
T/T	1.000	-	-
T/C	1.372	0.906-2.079	0.135
C/C	2.711	1.331-5.524	0.006
<b><i>GST M1</i></b>			
Present	1.000	-	-
Null	1.012	0.683-1.500	0.952

Binominal logistic regression test



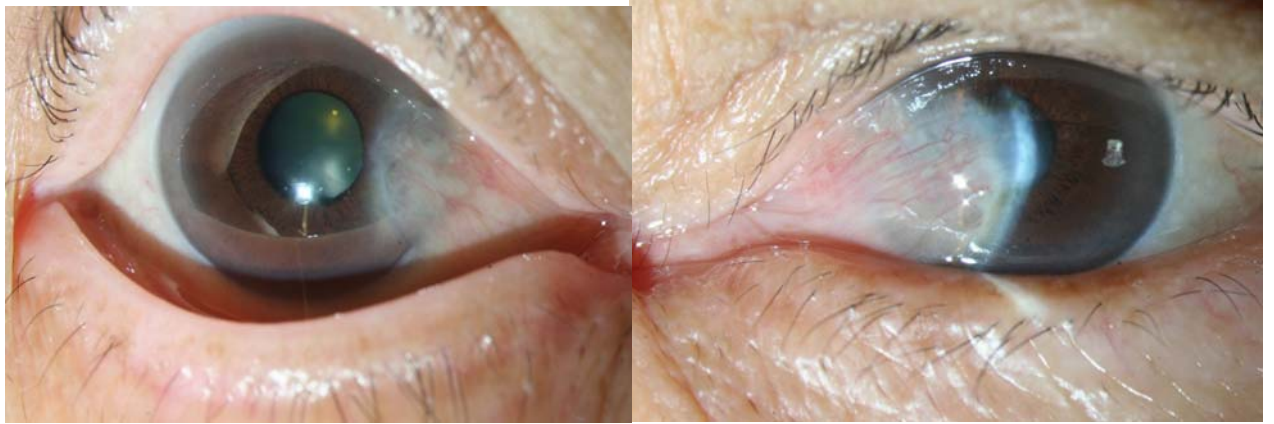
表五 *CYP1A1* 及 *GST M1* 多型性對眼翳  
危險因子的多元邏輯迴歸分析

	Adjusted OR	95%CI	<i>p</i> -value
<b><i>CYP1A1</i></b>			
Polymorphism/wild type	1.533	1.027-2.290	0.037
<b><i>GST M1</i></b>			
Null / present type	0.990	0.666-1.471	0.959

Multiple logistic regression test







圖一 眼翳臨床外觀

眼翳 pterygium 源於希臘字 pterygos，翼的意思，因為臨床外觀狀如翼 (wing-shaped)，為隆起皺摺的結膜伴有纖維血管(fibrovascular)增生的慢性發炎組織，翼狀或三角尖端朝向眼角膜，會慢慢往眼角膜上生長，進而遮蔽視線或者造成散光影響視力。



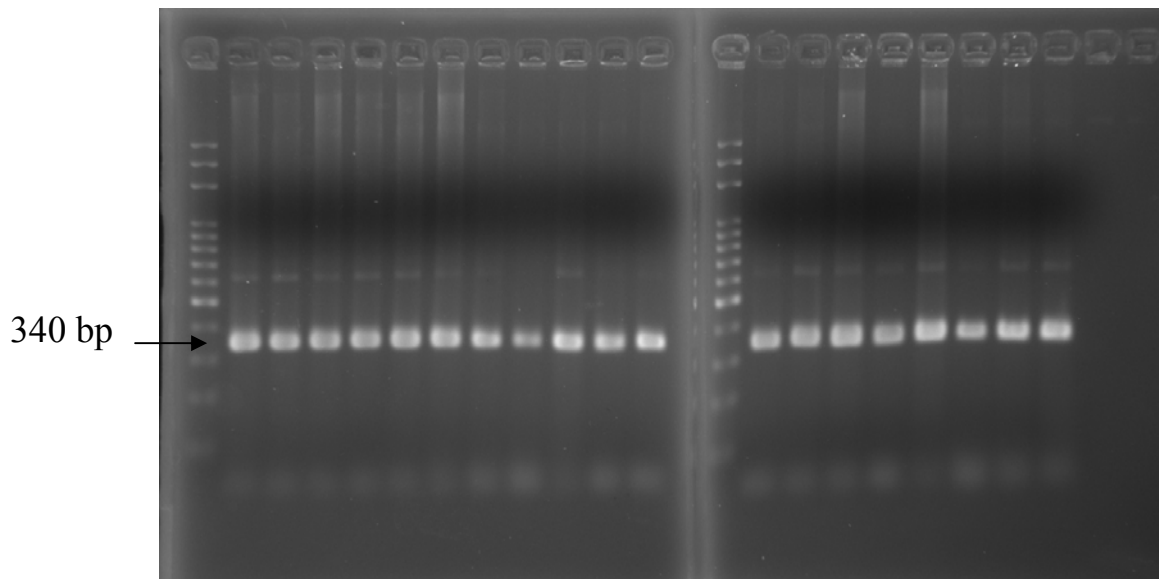
```

241 tgtagggagg aagaagagga gtagcagtg aagagggtga gccgctgcac ttaagcagtc
301 tgtttgaggg acaagactct attttttgag acaggggtccc caggctatcc aggctggagt
361 gcactggtag cattttgttt cactgtaacc tccacctcct gggctcacac gattctccca|
                                     MspI
421 cctcagcctc tgagtagttg gggccgcccag acgccaccac agcttttttt tttttttttt
481 tttttttttg tagagatggg gtttcacat gttgcccagg ctggtctcaa actcctgagc
541 tcaagtgatc cacctgcctc agcctcccaa agtgctggga ttacaggcat gagacaagac
601 tcctaatacac tigtctgtct tagcgccctc tctaacttat cacaaattga

```

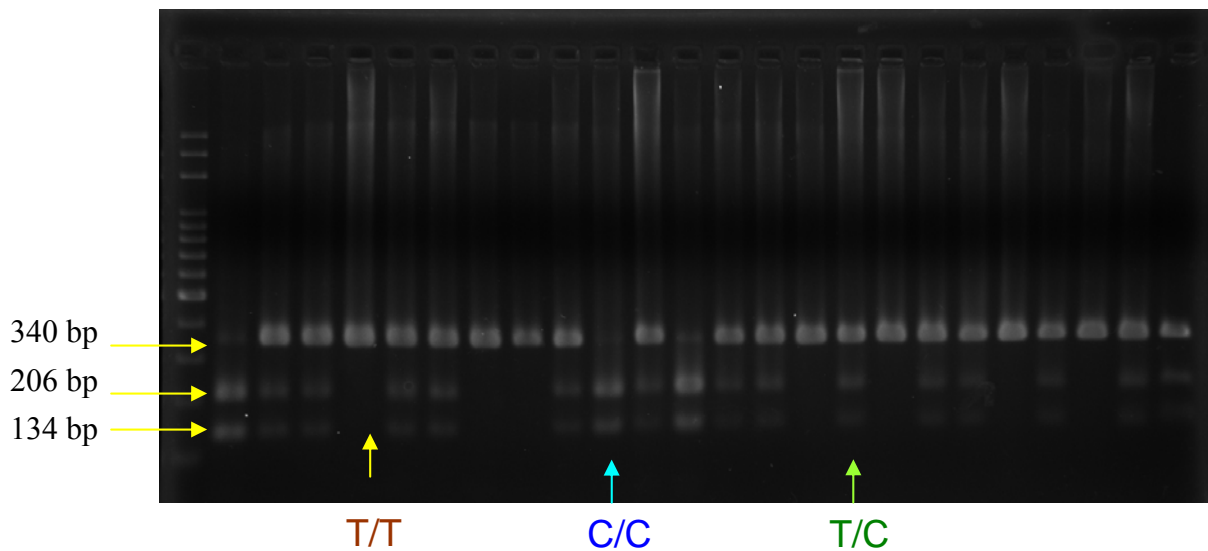
圖二 *CYP1A1* PCR 引子與引子所放大的序列及 *MspI* 限制酶辨識位置

*CYP1A1* 基因部分序列如圖，PCR 產物長度由 NCBI 網站上查詢及參考其他文獻記載，所設計的引子將放大 *CYP1A1* 第 266 個鹼基至第 605 個鹼基，為一段 340bp 長的片段產物，而限制酶：*MspI* 所辨識的序列為一 CCGG 的雙股反向重複序列 (reverse palindrome)，*MspI* 會切在 CC 之間，*CYP1A1* 基因上第 400 個鹼基在野生型(wild type)為 T 鹼基，在變異型則有 C 鹼基(包含同型合子 C/C 及異型合子 T/C)(T6235C)，會使得原本 CTGG 的序列變成 CCGG 序列，且為 *CYP1A1* 上唯一的一段 CCGG 序列，使得 *MspI* 限制酶會將變異型 DNA 序列切成 2 段，一段長 206bp，另一段長 134bp。



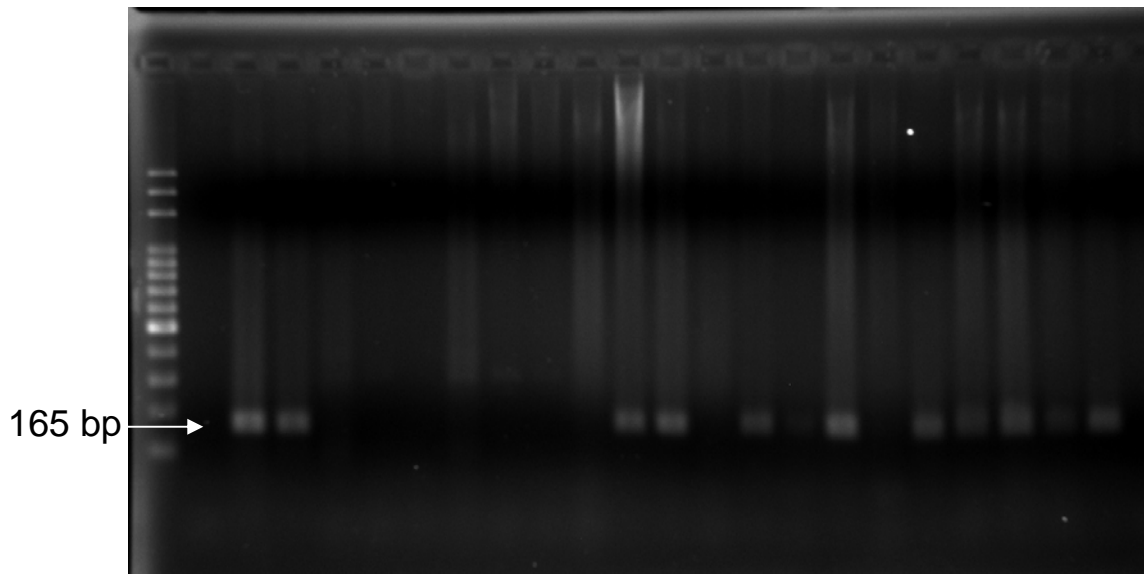
圖三 *CYP1A1* PCR 產物電泳結果

PCR 產物長度由 NCBI 網站上 引子查詢及參考其他文獻記載得知片段長為 340 bp，總共 205 個眼翳檢體及 206 個對照組血液檢體皆可獲得專一長度的 PCR 產物片段，並符合預期的 340 bp 長。



圖四 *CYP1A1* *MspI* PCR-RFLP 多型性的電泳膠圖結果與判讀

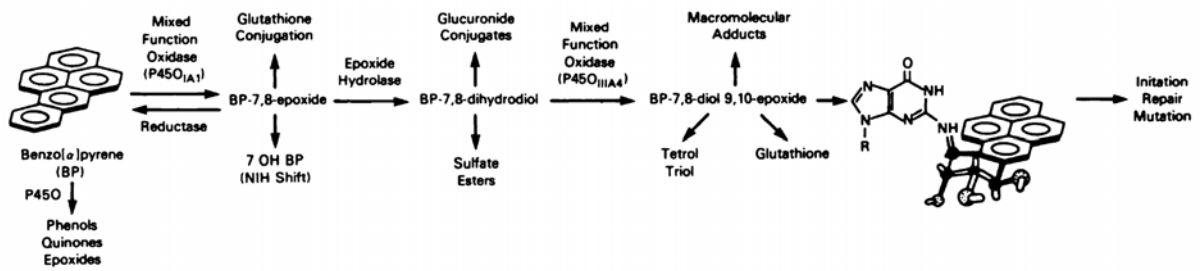
*CYP1A1* 基因上 T6235C 的多型性，使得以 *MspI* 限制酶處理後產生長短不同的基因片段，*MspI* 限制酶辨識的序列為 CCGG，遇到這樣的序列會從 CC 間將 DNA 序列切斷，所以如果基因型為同型合子野生型 T/T 型，其序列為 CTGG，不會被限制酶切斷，呈現的產物是 PCR 產物的原片段長即 340 個 bp；如果基因型是同型合子變異型 C/C 型，其序列為 CCGG，會被限制酶切成 2 段，呈現的產物有兩種片段長度，即 206 bp 及 134 bp 2 種片段長度；若為異型合子變異型 T/C 型，則 340 bp，206bp 及 134 bp 3 種片段長度都有。



圖五 *GST M1* PCR 產物的電泳膠圖結果及多型性表現判讀

*GST M1* gene 是一個約 11kb 長的 gene，所設計出來的專一性引子是用來放大 *GST M1* 序列內一段 165bp 長的片段，所以 PCR 產物有 2 種結果，一是檢體 DNA 序列沒有缺失性變異，可以放大出標的片段 165bp，此即為 present 基因型；另一種是檢體 *GST M1* DNA 序缺失性變異，無引子可辨識序列，沒有 PCR 產物，此即為 *GST M1* null type。

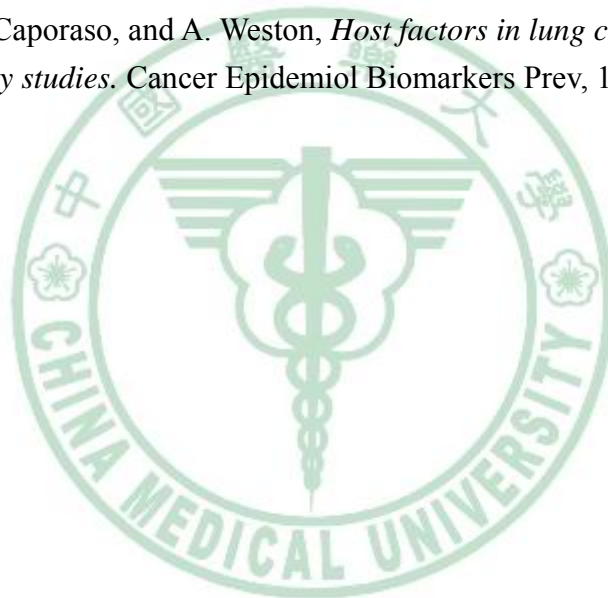
## 附錄

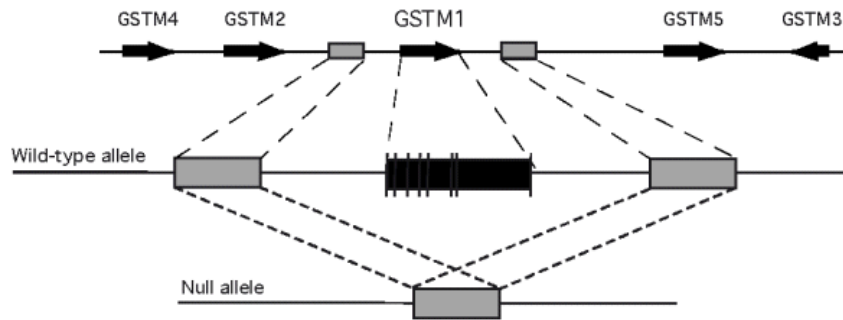


圖一 BaP 與 BPDE(BP-7,8-diol 9,10-epoxide)之代謝

本圖摘自[82]：

Amos, C.I., N.E. Caporaso, and A. Weston, *Host factors in lung cancer risk: a review of interdisciplinary studies*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1992. **1**(6): p. 505-13.





圖二 *GSTM1* 基因的缺失變異原因

*GSTM1* 的基因多型性主要由於整段基因缺失而使其不表現(null allele)，造成此一變異的原因是因為 *GSTM1* 基因的 2 側各由一段長 4.2kb 幾乎相同的序列所包圍，*GSTM1* 基因的缺失變異就是由此 2 相似的序列同源重組(homologous recombination) 所造成。

([http://www1.elsevier.com/homepage/sab/oncoserve/cl\\_mr/par1.htm](http://www1.elsevier.com/homepage/sab/oncoserve/cl_mr/par1.htm))