

中國醫藥大學

碩士論文

編號：IEH-1601

探討暴露於菸害孕婦之修補基因和 DNA 損傷之
相關性

**Associations of repair gene polymorphisms and
genotoxicity of pregnant women exposed to
smoking hazard**

所別：環境醫學研究所

指導教授：吳芳鵞

學生：詹佳蓉 Chan, Chia-Jung

學號：9365001

中華民國 九十五年 六月

致謝

研究所二年的生活，轉眼間就度過了，回想起來真是多采多姿。在進行研究的過程中，我深深體驗到完成任何研究都是需要辛苦的付出，也需要許多人的合作與幫忙，在此感謝所有曾經幫助過我，使我可以順利完成這篇論文的每一個人。

首先要謝謝所有師長們對我的教導，特別感謝指導教授吳芳鵞老師這二年來對我的諄諄教誨，也在老師事務繁忙之時，撥出許多時間來指導我有關論文撰寫以及修改，在此深表感激。感謝口試委員劉紹興老師、翁瑞宏老師、賴俊雄院長、吳宏達老師在審查時給我的寶貴意見與指正，讓我有機會可以將論文做的更好。

另外要謝謝所上的同學，鈞萍、懷芝、乾華、嘉晃、舒婷、媛婷、耀慶、懿諄，學長建智、顯財，學弟妹姿明、仰辰、慶興、羽伶、佳琪，這兩年來在學業、實驗以及生活上給我的鼓勵和幫助，因為有你們才能讓我的研究所生活更豐富。還要謝謝在過去的求學過程中，伴隨我成長的所有師長與同學，因為有你們的勉勵，使我更有自信。

最後要深深感謝我親愛的父母，在我的求學過程中，不斷的支持與鼓勵，因為有你們的辛苦付出讓我在求學時可以無後顧之憂，我也很高興自己能夠不辜負你們的期望並且順利完成學業，最後，在此懷著感恩的心情，將這篇論文獻給我所摯愛的人們。

佳蓉 2006年6月22日

於中國醫藥大學環境醫學研究所

摘要

由過去的研究顯示吸菸或二手菸暴露者的修補基因多型性與 DNA 損傷的相關性呈現不一致的結果。本研究欲探討暴露於菸害之孕婦其修補基因多型性和 DNA 損傷的相關性，並進一步分析菸害暴露與修補基因多型性對 DNA 損傷是否具有交互作用。

以自願者方式徵求來自台中兩家醫學中心與一家區域醫院之參加產前檢查的懷孕婦女為研究對象。對孕婦進行問卷調查、可丁寧濃度測量、基因型分析及彗星試驗，總共有 237 名孕婦納入本次研究。以尿液、血液測量可丁寧濃度。以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 與限制酵素片段長度多型性 (RFLP) 對修補基因：XRCC1 (Arg399Gln)、XRCC3 (Thr241Met)、XPD (Lys751Gln) 和 hMLH1 (promoter G to A) 做基因型檢測。以彗星試驗 (comet assay) 測量 DNA 損傷的程度。

參與本研究的懷孕婦女共有 237 名的資料可供分析。非吸菸者有 102 名 (43%)、二手菸者有 118 名 (49.8%)、吸菸者有 17 名 (7.2%)。以孕婦尿液、血液進行分析，血液可丁寧平均濃度在吸菸組為 2.11 ng/ml，二手菸組為 1.02 ng/ml，非吸菸組為 0.62 ng/ml，尿液可丁寧平均濃度在吸菸組為 2.36 ng/ml，二手菸組為 2.25 ng/ml，非吸菸組為 1.42 ng/ml，血液及尿液中可丁寧濃度均隨著非吸菸、二手菸、吸菸之暴露程度增加而

有上升的趨勢。以彗星試驗測量孕婦 DNA 損傷的程度，DNA 損傷積分的平均值在吸菸組為 77.7，二手菸組為 83.4，非吸菸組為 65.2，顯示吸菸組與二手菸組之 DNA 損傷程度皆比非吸菸組高。

修補基因 hMLH1 A/A 或 G/A 基因型之 DNA 損傷程度是 G/G 基因型的 2.83 倍，且達到統計上顯著意義 (OR = 2.83 ; 95% CI : 1.13 – 7.05)，經過調整年齡、血清可丁寧濃度、尿液可丁寧濃度、喝酒習慣、香菸暴露狀態等變項後，修補基因 hMLH1 A/A 或 G/A 基因型之 DNA 損傷程度是 G/G 基因型的 3.49 倍，亦達到統計上顯著意義 (aOR = 3.49 ; 95% CI : 1.32 – 9.24)。四種修補基因隨著各個基因之變異型數目增加，DNA 損傷程度會增加，當個體單一個修補基因帶有變異型之 DNA 損傷積分平均值，在吸菸組為 68.6，二手菸組為 74，非吸菸組為 64.3，吸菸組與二手菸組之 DNA 損傷程度皆比非吸菸組高；當個體的修補基因有二個及二個以上同時帶有變異型之 DNA 損傷積分的平均值，在吸菸組為 84.1，二手菸組為 96，非吸菸組為 69.4，吸菸組與二手菸組之 DNA 損傷程度皆比非吸菸組高，且達到統計上顯著意義 ($p = 0.002$)。特別是暴露於二手菸的狀態下，個體修補基因有二個及二個以上同時帶有變異型之 DNA 損傷積分的平均值為 96，比單一個修補基因帶有變異型的 74 還要高，且達到統計上顯著意義 ($p = 0.021$)。

本研究顯示暴露於二手菸或吸菸的孕婦所誘發的 DNA 損傷比非吸

菸者高。hMLH1 基因型可能調控吸菸或二手菸的暴露狀態與 DNA 損傷程度之間的相關性。吸菸或二手菸暴露且帶有修補基因變異型的孕婦對 DNA 損傷可能具有加成作用。



關鍵字：可丁寧、修補基因、DNA 損傷、彗星試驗

Abstract

The purpose of this study was two folded. First, we examined the possible effect of cigarette smoking and environmental tobacco smoke (ETS) on the health of pregnant women, by measuring cotinine concentrations and comet assay. Second, the correlations of repair gene polymorphisms and genotoxicity of gestation women were analyzed.

With consented, pregnant women participated prenatal care at two medical centers and one regional hospital in central Taiwan were recruited in this study. The subjects were to complete a questionnaire, cotinine measuring, genotyping and comet assay. Two hundreds thirty-seven pregnant women were included in this research. The urine and serum cotinine concentrations were measured. Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) method was utilized to determine XRCC1, XRCC3, XPD and hMLH1 genotypes. DNA damage was measured by comet assay.

The 237 pregnant participants included 102 (43%) non-smokers, 118 (49.8%) passive smokers, and 17 (7.2%) smokers. The level of serum cotinine was 2.11 ± 1.89 ng/ml in smokers, 1.02 ± 1.81 ng/ml in passive smokers, 0.62 ± 1.11 ng/ml in non-smokers. The level of urine cotinine was 2.36 ± 2.94 ng/ml in smokers, 2.25 ± 3.15 ng/ml in passive smokers, 1.42 ± 2.19 ng/ml in non-smokers. The findings indicated that the cotinine levels in serum and urine elevated significantly as the exposure to ETS and smoking increased. The DNA damage value was 77.7 ± 51.6 in smokers, 83.4 ± 45.5 in passive smokers, and 65.2 ± 34.9 in non-smokers, and the level of DNA damage

among the ETS group was significantly higher than that of non-smoking group ($p < 0.001$).

The value of DNA damage among women with hMLH1 A/A or G/A genotypes was significantly higher than subjects with G/G genotype (OR = 2.83; 95% CI: 1.13-7.05) (aOR = 3.49; 95% CI: 1.32-9.24). Combined gene effects upon DNA damage were observed. The DNA damage value was 68.6 ± 47.5 in smokers, 74 ± 43.5 in passive smokers, and 64.3 ± 32.2 in non-smokers for the pregnant woman had one variant genotype. The DNA damage value was 84.1 ± 55.8 in smokers, 96 ± 44.5 in passive smokers, 69.4 ± 35.9 in non-smokers for the pregnant woman had more than two or equals two variant genotypes. The level of DNA damage among the pregnant woman with more than two variant genotypes in ETS group was significantly higher than that of the non-smoking group ($p = 0.002$). The level of DNA damage among the pregnant woman with more than two variant genotypes was higher than that with one variant genotype, especially in ETS group ($p = 0.021$).

In conclusion, the level of DNA damage among the smoking and ETS groups was significantly higher than that of non-smoking group. hMLH1 A/A or G/A genotypes may modify the association between Smoking or ETS-exposed and DNA damage. Exposed to smoking and carrying at least two variant genotypes among XRCC1, XRCC3, XPD, hMLH1 may be associated with DNA damage in pregnant women.

Key words: cotinine, repair gene, DNA damage, comet assay

目錄

致謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	V
目錄.....	VII
表目錄.....	IX
第一章、前言.....	1
第二章、文獻探討.....	4
一、吸菸相關的盛行率.....	4
二、香菸的危害.....	5
三、修補基因.....	6
四、修補基因多型性與頻率.....	7
五、修補基因多型性與 DNA 損傷.....	8
第三章、材料與方法.....	10
一、研究設計.....	10
二、研究對象.....	11
三、研究方法.....	11
四、統計方法.....	24

五、 使用藥劑.....	25
六、 實驗材料.....	27
七、 使用儀器.....	28
第四章、結果.....	29
一、 懷孕婦女之基本資料分析.....	29
二、 孕婦之可丁寧濃度與 DNA 損傷程度分析.....	30
三、 四種修補基因之對偶基因及基因型分析.....	31
四、 孕婦吸菸狀態及其修補基因型與 DNA 損傷程度之分析.....	32
五、 修補基因型與 DNA 損傷程度之相關性分析.....	33
六、 修補基因變異個數對 DNA 損傷程度之分析.....	33
七、 可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性分析.....	34
第五章、討論.....	35
第六章、結論.....	42
第七章、參考文獻.....	43
表格.....	50

表目錄

表一、懷孕婦女之基本資料.....	50
表二、孕婦之可丁寧濃度與 DNA 損傷程度.....	52
表三、四種修補基因之對偶基因及基因型分析.....	53
表四、孕婦吸菸狀態及其修補基因型與 DNA 損傷程度之分析.....	54
表五、四種修補基因型與 DNA 損傷程度之相關性.....	55
表六、修補基因變異個數對 DNA 損傷程度的影響.....	56
表七、孕婦血液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性.....	57
表八、孕婦尿液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性.....	58



第一章 前言

根據世界衛生組織指出，2002 年全球吸菸人口數為 12.5 億（男 16 %、女 4%）⁽¹⁾。在美國婦女的吸菸盛行率約有 25%⁽²⁾，而在台灣的吸菸人口數，根據國民健康局於 2002 年調查十五歲以上國人吸菸盛行率為 27.2%，在男性中有 48% 的人幾乎每天吸菸，女性中每天吸菸的為 5.8%⁽³⁾。台灣地區二手菸資料，十五歲以上國人在家中會吸到二手菸為 47.6%（男 43.6%、女 51.8%），在工作場合（或上學地點）有同事在工作場合（或同學在室內）吸菸為 48.6%（男 56%、女 39.4%）⁽³⁾。有關懷孕婦女吸菸率的調查，美國在 2002 年懷孕婦女吸菸率為 11.4%⁽⁴⁾，林等人⁽⁵⁾於 2004 年調查發現國內懷孕婦女的吸菸率為 6.4%。

吸菸會對人體健康造成危害，然而女性吸菸盛行率不斷上升，女性吸菸者年齡層逐漸下降，尤其是懷孕婦女吸菸及暴露二手菸對於胎兒的影響更為嚴重^(4, 6)。許多研究亦指出，婦女在懷孕期間吸菸或暴露二手菸，會增加低出生體重的新生兒，且死亡率會增高，二手菸暴露與懷孕婦女吸菸等公共衛生議題日益受重視^(6, 7)。

香菸中含有多種致癌物質，例如多環芳香族碳氫化合物（PAHs）、芳香胺及亞硝胺類等物質會對 DNA 造成損傷⁽⁸⁾。人體的代謝能力和修補能力與基因多型性有關，基因多型性亦是導致個體間對香菸中致癌物

質感受性不同的主要原因^(9, 10)。因此，基因多型性可能會改變基因毒性的結果⁽¹¹⁾。

有許多研究顯示 DNA 修補基因多型性與香菸暴露所造成的 DNA 損傷及癌症增加有關^(12,13,14)。修補基因 XRCC1 屬於鹼基切除修補系統，有關台灣人 XRCC1 Gln 對偶基因頻率為 0.26⁽¹⁵⁾，過去研究顯示帶有 Gln / Gln 或 Arg / Gln 基因型之個體其姐妹染色分體交換頻率顯著高於 Arg / Arg 基因型者 ($p < 0.05$)，且發現 XRCC1 和香菸暴露狀態之交互作用與姐妹染色分體交換頻率之間具有相關性 ($p = 0.02$)⁽¹⁶⁾。修補基因 XRCC3 屬於同源雙股 DNA 修補酵素系統，有關芬蘭的 XRCC3 Met 對偶基因頻率為 0.31，帶有 Met / Met 基因型者之染色體異常頻率顯著高於 Thr / Thr 基因型者，且發現 XRCC3 基因與染色體異常頻率之間具有相關性 ($p = 0.028$)⁽¹⁷⁾。修補基因 XPD 屬於核苷酸切除修補系統，有關德國人 XPD Gln 對偶基因頻率為 0.32⁽¹⁸⁾，帶有 Gln / Gln 或 Lys / Gln 基因型者之 DNA 損傷程度比 Lys / Lys 基因型者高⁽¹⁹⁾。修補基因 hMLH1 參與錯誤配對的修補方式，有關韓國的 hMLH1 A 的對偶基因頻率為 0.53，帶有 A / A 基因型者得到肺癌的風險是 G / G 或 G / A 基因型的 1.57 倍⁽²⁰⁾。

彗星試驗是一個快速測量 DNA 損傷程度的方法，目前已被廣泛用於測量香菸所引起的 DNA 損傷^(21, 22, 23)，根據過去的研究顯示，吸菸者 DNA 損傷程度比非吸菸者高，當 XPD 帶有 Gln / Gln 或 Lys / Gln 基因型者之

DNA 損傷程度比 Lys / Lys 基因型高，但並無顯著差異，而且在 XRCC1 (Arg399Gln)、XRCC3 (Thr241Met) 及 XPD (Lys751Gln) 基因未發現有相關性存在⁽¹⁸⁾。過去有關吸菸或二手菸暴露者的修補基因多型性與 DNA 損傷的研究結果並不一致^(15, 16, 17, 18, 19, 20)。

因此，本研究目的為：

1. 比較三組孕婦（吸菸組、二手菸組及非吸菸組）之體內可丁寧濃度與 DNA 損傷程度。
2. 探討四個修補基因 XRCC1、XRCC3、XPD 和 hMLH1 之對偶基因頻率及基因型分布。
3. 探討暴露於菸害之孕婦其修補基因多型性和 DNA 損傷的相關性。
4. 了解菸害暴露與四種修補基因多型性對 DNA 損傷是否具有交互作用。
5. 探討孕婦體內可丁寧濃度與 DNA 損傷程度是否具有相關性。

第二章 文獻探討

一、吸菸相關的盛行率

根據世界衛生組織的資料顯示，2002 年全球吸菸人口數為 12.5 億(20%)，其中男性約有 10 億 (16%)，女性約有 2.5 億 (4%)。有關男性吸菸人口，在已開發國家中約有 35%，開發中國家則有 50%，目前在已開發與開發中的男性抽菸人口有減少的趨勢，美國為 26%，英國為 28%，日本為 54%，但在中國的男性抽菸者卻高達 3 億人。在女性吸菸人口資料，在已開發國家中約有 22%，開發中國家則有 9%，女性的吸菸人口在美國 (22%)、英國 (26%)、日本 (14%) 等已開發國家中有減少的趨勢，但在許多歐洲的已開發國家 (如德國 31.0%、法國 30.3%、南斯拉夫 42.0%) 中卻是增加的⁽¹⁾。

在台灣吸菸盛行率的資料，根據行政院衛生署國民健康局人口與健康調查研究中心，調查「民國九十一年台灣地區國民健康促進知識、態度與行為」的研究顯示，十五歲以上國人吸菸盛行率為 27.2%，而在男性中有 48% 的人幾乎每天吸菸，女性中每天吸菸的比率為 5.8%⁽³⁾。董氏基金會在民國八十七年、八十九年的調查指出⁽²⁴⁾，18 歲以上國人吸菸盛行率為 23.0%，而在男性中有 40.5%，在女性中為 7.8%。第一次吸菸的年齡最常在小學五、六年級，在台北地區國小高年級學童中吸菸盛行

率為 2.9%，在男性學童中有 4.9%，在女性學童中有 0.8%，國中、高中、高職學生的吸菸盛行率為 46.6%，在男生中有 54.8%，在女生中有 37.2%。有關二手菸的盛行率調查，台灣地區十五歲以上國人在家中會吸到二手菸為 47.6%，在男性中有 43.6%，在女性中有 51.8%，在工作場合（或上學地點）有同事在工作場合（或同學在室內）吸菸為 48.6%，在男性中有 56%，在女性中有 39.4%⁽³⁾。

有關美國的懷孕婦女吸菸率調查，在 1990 年為 18% 至 1997 年下降為 13%，但在 15 - 19 歲的懷孕女性吸菸的比率最高為 18%，且有逐年上升的趨勢⁽⁶⁾。在 2002 年懷孕婦女吸菸率為 11.4%，在 18-19 歲的懷孕女性吸菸的比率是最多的為 18.2%⁽⁴⁾。林等人⁽⁵⁾於 2003 年調查國內懷孕婦女吸菸率為 6.4%，年齡較輕的孕婦吸菸率較高，十五歲以上女性吸菸盛行率，依年齡做分層，以 18 - 24 歲的適婚女性吸菸率最高為 8.7%⁽²⁵⁾。

二、香菸的危害

香菸由四千多種成分組成，其中有四十多種屬於致癌物質，例如多環芳香族碳氫化合物（PAHs）、芳香胺及亞硝胺類物質⁽⁷⁾。較具代表性的有害物質為尼古丁，經由香菸吸入體內，會代謝成不同的尼古丁物質，因為尼古丁的半衰期短，半衰期較長的主要代謝物—可丁寧（cotinine）是較常被測量的生物指標⁽²⁶⁾。研究顯示，若婦女懷孕期間吸菸，會使尼

古丁代謝成可丁寧的速率加快，進而影響人體、胎兒及新生兒的健康⁽²⁷⁾。有許多疾病與吸菸有關，美國女性 90% 的肺癌是由吸菸所造成的，吸菸亦會導致冠狀動脈心臟病、慢性阻塞性肺病發生，與吸菸有關的癌症風險會增加，如肝癌、口咽癌、膀胱癌、大腸直腸癌、子宮頸癌等，孕婦吸菸或暴露二手菸，不僅有害健康，更會造成胎兒及新生兒的健康危害，低出生體重嬰兒的比率上升（12%），子宮內生長阻礙、生產合併症、死胎、新生兒死亡的風險增加⁽²⁾。

三、修補基因

當環境中的致癌物質如香菸中的多環芳香族碳氫化合物（PAHs）、芳香胺及亞硝酸類物質，經由香菸的暴露進入人體後，人體內會經由 Phase I 與 Phase II 酵素的代謝解毒作用，將有害物質排出人體以保健康⁽⁷⁾。若致癌物質無法完全清除，對 DNA 造成損傷時，DNA 修補作用即會開啟，主要是修補或移除受損的 DNA，以確保基因的完整性和正確性⁽²⁸⁾。根據不同的損傷方式而開啟不同的修補方式，DNA 修補酵素系統可分為以下四種方式：鹼基切除修補（base excision repair, BER）、同源雙股 DNA 修補（homologous recombination repair, HR）、核苷酸切除修補（nucleotide excision repair, NER）、錯誤配對修補（mismatch repair, MMR）^(18, 29)。

四、修補基因多型性與頻率

DNA 修補酵素系統相當複雜，最近已有許多 DNA 修補基因的多型性被發現，且與香菸暴露所造成的 DNA 損傷及癌症增加有關，其中包含 XRCC1、XRCC3、XPD 及 hMLH1 基因^(29, 30, 31, 32)。XRCC1 基因 exon 10 的第 28152 個核苷酸由 G 轉變成 A，轉譯在第 399 個胺基酸由 Arg 變成 Gln，XRCC1 基因屬於鹼基切除修補系統之一，是修補單股 DNA 斷裂的重要蛋白質。XRCC3 基因 exon 7 之 18067 核苷酸的位置上由 C 轉變成 T，轉譯在第 241 個胺基酸由 Thr 變成 Met，XRCC3 基因屬於同源雙股 DNA 修補酵素系統之一，是穩定 Rad51 蛋白質必要的酵素。XPD 基因在 exon 23 的第 35931 個核苷酸有 A 變成 C 的突變，轉譯在第 751 個胺基酸的位置，由 Lys 變成 Gln，XPD 基因參與核苷酸切除修補系統，XPD 也是轉錄因子（transcription factor）之一。hMLH1 則在啟動子的核苷酸中帶有 G 變成 A 的突變，hMLH1 基因參與錯誤配對的修補方式⁽²⁸⁾。

DNA 修補作用非常複雜，所參與的蛋白質很多，根據目前已知修補基因多型性的研究，分別挑選參與不同修補方式的基因，並考慮其對偶基因頻率大於 0.2，選取 XRCC1、XRCC3、XPD 及 hMLH1 基因多型性來探討，XRCC1 Gln 對偶基因頻率為 0.24⁽²⁹⁾，XRCC3 Met 對偶基因頻率為 0.43⁽²⁹⁾，XPD Gln 對偶基因頻率為 0.32⁽²⁹⁾，hMLH1 A 對偶基因頻率為 0.46⁽³²⁾。許多探討基因多型性與癌症風險增加的相關性研究結果並

不一致，可能是因為不同種族的對偶基因頻率不同所造成的⁽³³⁾。

五、修補基因多型性與 DNA 損傷

根據研究指出，香菸暴露會誘導許多疾病與癌症發生，香菸中的致癌物質會與 DNA 結合，形成 DNA adduct，扮演了致癌性的關鍵角色。研究證實 DNA adduct 與癌症風險增加有關⁽³⁴⁾，另外，在二手菸暴露的孕婦體內 PAH-DNA adduct 比沒有受到二手菸暴露的孕婦高⁽³⁵⁾。香菸暴露是癌症的危險因子之一，然而代謝與修補基因的基因多型性，亦是造成癌症的遺傳易感受因子之一⁽³³⁾。

常被用來測量 DNA 受損情況的方式有：染色體異常 (chromosomal aberration, CA)、姐妹染色分體交換 (sister chromatid exchange, SCE)、微核測試 (micronuclei, MN) 及彗星試驗 (comet assay)⁽³⁶⁾。根據以前的研究顯示，以染色體異常頻率當作 DNA 損傷程度的結果發現，XRCC3 基因帶有 Met / Met 基因型者之 DNA 損傷程度顯著高於帶有 Thr / Thr 基因型者，且發現 XRCC3 基因與染色體異常頻率之間具有相關性 ($p = 0.028$)⁽¹⁷⁾。使用測量姐妹染色分體交換頻率作為 DNA 損傷程度的研究結果發現，吸菸組之 DNA 損傷程度高於非吸菸組，當 XRCC1 基因帶有 Gln / Gln 或 Arg / Gln 基因型者之 DNA 損傷程度顯著高於 Arg / Arg 基因型 ($p < 0.05$)，且發現 XRCC1 和香菸暴露狀態之交互作用與姐妹染色分體交換

頻率之間具有相關性 ($p = 0.02$)⁽¹⁶⁾。以微核發生頻率當作 DNA 損傷程度的結果顯示, XRCC1 Gln / Gln 或 Arg / Gln 基因型者和 XRCC3 Met / Met 或 Thr / Met 基因型者之微核發生頻率高於 XRCC1 Arg / Arg 和 XRCC3 Thr / Thr 基因型者, 但並無顯著差異, 且發現抽菸狀態對微核發生頻率沒有影響⁽³⁷⁾。其中彗星試驗是一種可以快速測量 DNA 損傷程度的方法, 目前已被廣泛使用並測量香菸所引起的 DNA 損傷^(23, 38), 過去有研究利用彗星試驗發現, 吸菸者之 DNA 損傷程度比非吸菸者較高, 當 XPD 帶有 Gln / Gln 或 Lys / Gln 基因型者之 DNA 損傷程度比 Lys / Lys 基因型高⁽¹⁹⁾。



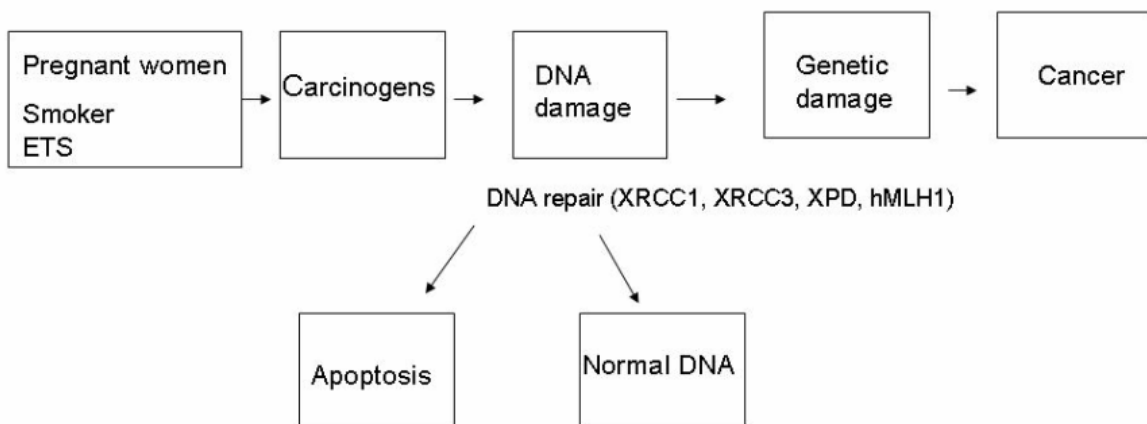
第三章 材料與方法

一、研究設計

(I) 收樣流程

參與本研究的懷孕婦女共有 685 名
1.問卷調查
2.收集第一孕期血液樣本進行基因型分析
3.收集第一、第二孕期血液及尿液樣本進行可丁寧濃度分析
4.生產時收集血液樣本進行彗星試驗
完成上述四項檢測之孕婦共有 237 名

(II) 香菸之致癌物質在人體內之代謝路徑



二、研究對象

研究對象來自衛生署國民健康局九十二年度菸害防治計畫⁽³⁹⁾，由參加產前檢查的懷孕婦女中，以自願者方式徵求，分別來自兩家醫學中心（中山醫學大學附設醫院、中國醫藥大學附設醫院）與一家區域醫院（行政院衛生署立台中醫院）。自民國 92 年 8 月開始收案，截至民國 93 年 10 月 31 日止，第一孕期孕婦共計 314 人，第二孕期孕婦共計 588 人（其中追蹤個案者為 215 名，新進個案為 373 名），生產期孕婦共計 398 名。對孕婦進行問卷調查、可丁寧濃度測量、基因型分析及彗星試驗等四個項目均完成共有 237 名孕婦納入分析。並以暴露狀態分組，吸菸組 17 名（7.2%）、二手菸組 118 名（49.8%）、非吸菸組 102 名（43.0%）。以上研究對象經過醫師診斷皆無任何呼吸性疾病、新陳代謝異常者。

三、研究方法

1. 問卷調查

參與研究的孕婦均已完成問卷調查，內容包括人口學資料、生產史、疾病史、吸菸暴露狀態等。依據孕婦填答的問卷內容，區分為吸菸組、二手菸組與非吸菸組。本研究所定義的「吸菸」，指的是孕婦在問卷中回答目前有吸菸或是已經戒菸；暴露狀態為「二手菸」的孕婦則是指排除吸菸個案後，在問卷中回答配偶有吸菸習慣或是在工作場所內可聞到菸

味的個案；暴露狀態為「非吸菸」的個案則代表那些不屬於吸菸與二手菸個案的孕婦。

2. 分析方法.

(1) 血液及尿液可丁寧測定及分析方法由本校環境醫學研究所郭憲文教授之研究室進行實驗。

(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°C 冰箱內，以抽取 DNA 並進行基因型之分析。

(3) 生產時收集孕婦血液並在 24 小時之內，由本研究室楊建智學長完成彗星試驗。

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 1200 rpm 15 分鐘，去除上清液後重複上述動作一次，之後加入 1 ml 的 GenoMarker reagent。在室溫下靜置 5 分鐘。之後加入 0.5 ml chloroform 上下搖晃均勻，離心 12,000 rpm，4°C 5 分鐘。取出上清液放入新的 1.5 ml 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°C 下離心 12,000 rpm，10 分鐘，小心去除上清液，加入 0.3 ml 70% ethanol，離心 12,000 rpm，10 分鐘，去除上清液後，此步驟再重複一次。移除上清液後，將管子倒

置隔夜晾乾，之後將 DNA 溶於 10% TE buffer 100 μ l 中隔夜消化後，以 1% agarose gel 進行前測。完成後置於 -20°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 length polymorphisms, RFLP) 方法，對 XRCC1、XRCC3、XPD 及 hMLH1 基因進行基因型檢定⁽²⁸⁾。

I. XRCC1 (codon399) polymorphism

(1) Primer 序列

5'- TTGACCCCCAGTGGTGCTAA -3'

5'- GGCTGGGACCACCTGTGTT -3'

(2) PCR 反應溶液之配置

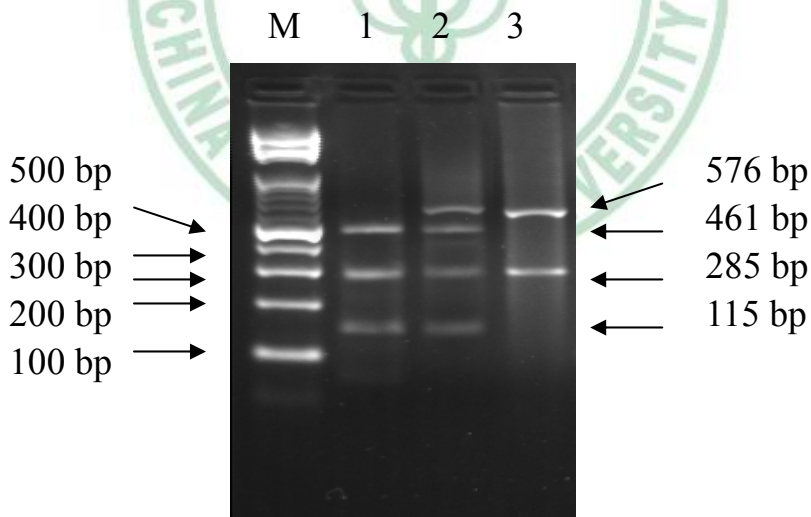
- a. DNA 2 μ l
- b. XRCC1 primer 各 1 μ l
- c. 去氧核苷三磷酸 (dNTP) 5 μ l
- d. Pro Taq buffer 5 μ l
- e. Taq 聚合酶 (Taq polymerase) 1 μ l
- f. 最終體積以蒸餾水調製成 50 μ l

(3) PCR 反應步驟

94 $^{\circ}\text{C}$ 、4 分鐘作為預變性 (pre-denature)，其次以 94 $^{\circ}\text{C}$ 、40 秒；

58°C、30 秒；72°C、40 秒的條件循環反應 35 次，最終設定 72°C、10 分鐘，使產物延展更完全。之後在 PCR 產物內加入 Msp I 限制酶、限制酶反應液及蒸餾水，共 20 µl，並置於 37°C 水浴槽內 3 小時。再以 3% agarose gel 進行電泳分析。

聚合酶鏈鎖反應產物為 861 bp。XRCC1 Arg / Arg (野生型) 兩條對偶基因具有二個 Msp I 限制酶切割點，故電泳結果有三個 DNA 片段，其長度為 461 bp、285 bp 和 115 bp。若屬於 Gln / Gln (變異型)，因兩個對偶基因只含有一個 Msp I 限制酶切割點，故可切成兩個 DNA 片段：576 bp 與 285 bp。若同時出現 576 bp、461 bp、285 bp 與 115 bp 的 DNA 片段則為 Arg / Gln 基因型 (野生變異型)。



1: XRCC1 Arg / Arg (野生型)

2: XRCC1 Arg / Gln (野生變異型)

3: XRCC1 Gln / Gln (變異型)

M: Maker

II. XRCC3 (codon241) polymorphism

(1) Primer 序列

5'- TCGCCTGGTGGTCATCGACTC -3'

5'- GCATCCTGGCTAAAAATACGAGC -3'

(2) PCR 反應溶液之配置

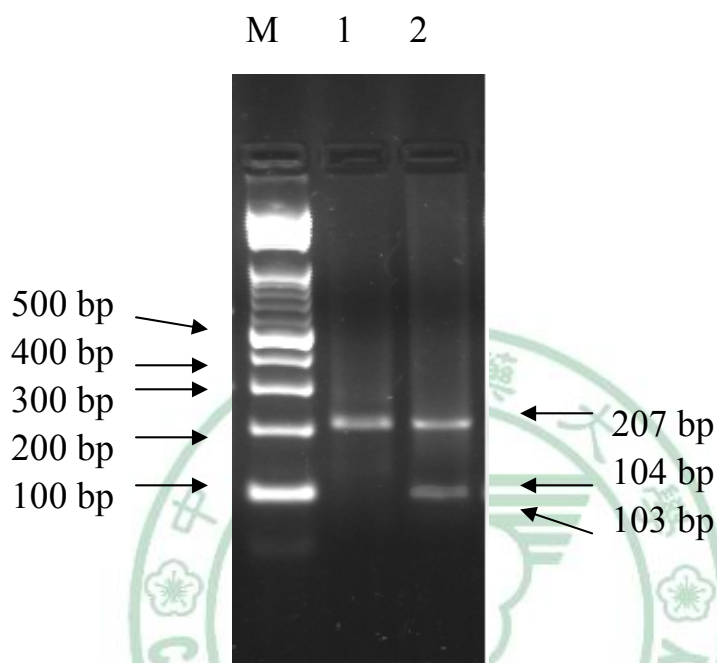
- a. DNA 2 μ l
- b. XRCC3 primer 各 1 μ l
- c. 去氧核苷三磷酸 (dNTP) 5 μ l
- d. Pro Taq buffer 5 μ l
- e. Taq 聚合酶 (Taq polymerase) 1 μ l
- f. 最終體積以蒸餾水調製成 50 μ l

(3) PCR 反應步驟

94°C、4 分鐘作為預變性，其次以 94°C、40 秒；55°C、30 秒；72°C、40 秒的條件循環反應 35 次，最終設定 72°C、10 分鐘，使產物延展更完全。之後在 PCR 產物內加入 NlaIII 限制酶、限制酶反應液、BSA 及蒸餾水，共 20 μ l，並置於 37°C 水浴槽內 3 小時。再以 3% agarose gel 進行電泳分析。

聚合酶鏈鎖反應產物為 207 bp。XRCC3 Thr / Thr (野生型) 兩條對偶基因不具有 NlaIII 限制酶切割點，故電泳結果只有一個 DNA 片段，其長度為 207 bp。若屬於 Met / Met (變異型)，因兩個對偶基因含有一個

NlaIII 限制酶切割點，故可切成兩個 DNA 片段：104 bp 與 103 bp。若同時出現 207 bp、104 bp 與 103 bp 的 DNA 片段則為 Thr / Met（野生變異型）。但是在全體研究對象中無發現 Met / Met 基因型的人。



1: XRC3 Thr / Thr（野生型）

2: XRC3 Thr / Met（野生變異型）

M: Maker

III. XPD (codon751) polymorphism

(1) Primer 序列

5'- AGGATCAGCTGGGCCTGTCCCTGC -3'

5'- TGTGGACGTGACAGTGAGAAAT -3'

(2) PCR 反應溶液之配置

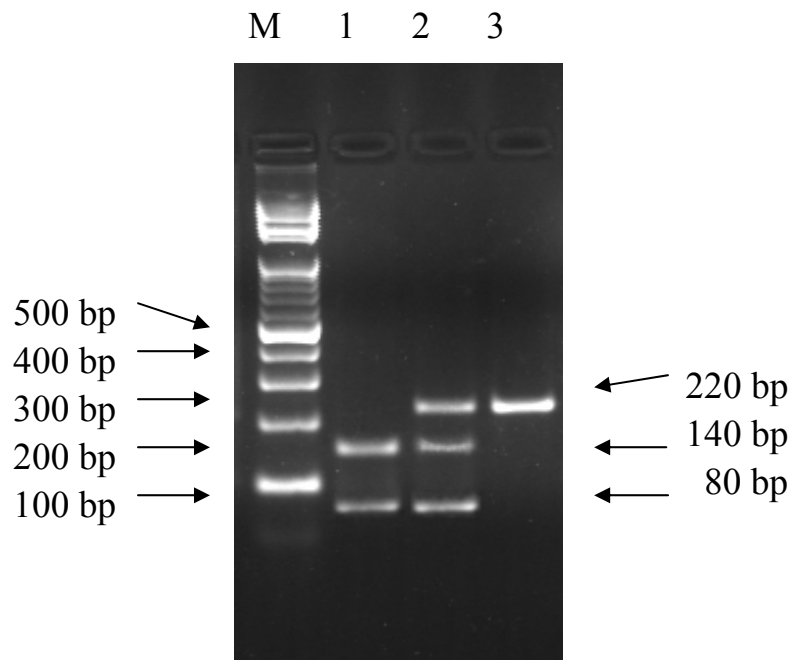
a. DNA 2 μ l

- b. XPD primer 各 1 μ l
- c. 去氧核苷三磷酸 (dNTP) 5 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

94°C、4 分鐘作為預變性，其次以 94°C、40 秒；55°C、30 秒；72°C、40 秒的條件循環反應 35 次，最終設定 72°C、10 分鐘，使產物延展更完全。之後在 PCR 產物內加入 MboII 限制酶、限制酶反應液及蒸餾水，共 20 μ l，並置於 37°C 水浴槽內 3 小時。再以 3% agarose gel 進行電泳分析。

聚合酶鏈鎖反應產物為 220 bp。XPD Lys / Lys (野生型) 兩條對偶基因具有一個 MboII 限制酶切割點，故電泳結果有二個 DNA 片段，其長度為 140 bp 和 80 bp。若屬於 Gln / Gln (變異型)，因兩個對偶基因不具有 MboII 限制酶切割點，故只有一個 DNA 片段：220 bp。若同時出現 220 bp、140 bp 與 80 bp 的 DNA 片段則為 Lys / Gln (野生變異型)。



1: XPD Lys / Lys (野生型)

2: XPD Lys / Gln (野生變異型)

3: XPD Gln / Gln (變異型)

M: Maker

V. hMLH1 promoter G to A

(1) Primer 序列

5'- AGTAGCCGCTTCAGGGA -3'

5'- CTCGTCCAGCCGCCGAATAA -3'

(2) PCR 反應溶液之配置

- a. DNA 2 μ l
- b. hMLH1 primer 各 1 μ l
- c. 去氧核昔三磷酸 (dNTP) 5 μ l
- d. Pro Taq buffer 5 μ l

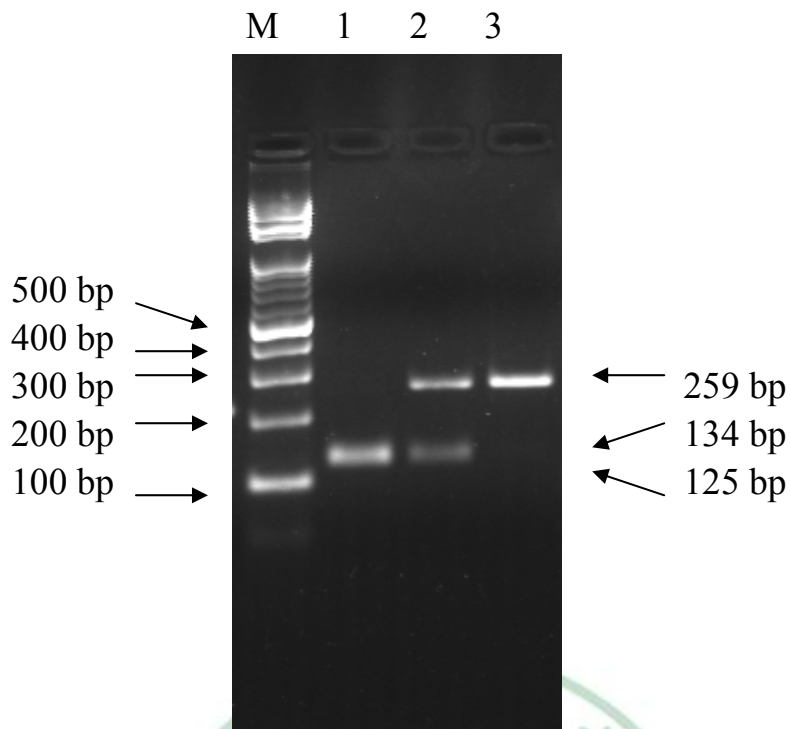
e. Taq 聚合酶 (Taq polymerase) 1 μ l

f. 最終體積以蒸餾水調製成 50 μ l

(3) PCR 反應步驟

94°C、4 分鐘作為預變性，其次以 94°C、40 秒；55°C、30 秒；72°C、40 秒的條件循環反應 35 次，最終設定 72°C、10 分鐘，使產物延展更完全。之後在 PCR 產物內加入 PvuII 限制酶、限制酶反應液及蒸餾水，共 20 μ l，並置於 37°C 水浴槽內 3 小時。再以 3% agarose gel 進行電泳分析。

聚合酶鏈鎖反應產物為 259 bp。hMLH1 G/G (野生型) 兩條對偶基因具有一個 PvuII 限制酶切割點，故電泳結果有二個 DNA 片段，其長度為 134 bp 和 125 bp。若屬於 A/A (變異型)，因兩個對偶基因不具有 PvuII 限制酶切割點，故只有一個 DNA 片段：259 bp。若同時出現 259 bp、134 bp 與 125 bp 的 DNA 片段則為 G/A (野生變異型)。



1: hMLH1 G / G (野生型)

2: hMLH1 G / A (野生變異型)

3: hMLH1 A / A (變異型)

M: Maker

5. 彗星試驗 (comet assay) 或單細胞凝膠電泳法 (single cell gel electrophoresis, SCGE)⁽⁴⁰⁾

先取 85 μ l 1% Normal melting point agarose (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 4 ml 血液，加入離心管與 4 ml PBS 混合均勻，將混合液”緩慢”注入 Histropauqe 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：

Histropauqe = 2 : 1。(2) 滴入混合液時要沿著管壁緩慢的滴入，勿將混

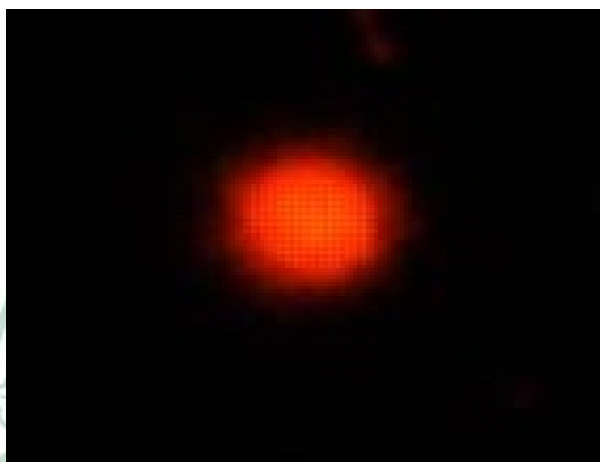
合液與分離液混合，否則分離的效果不佳。】。以 1800 rpm，離心 20 min (如果無明顯分層可再次離心)。離心結束後會分成三個色層，以滴管取出中間層的 lymphocytes 至另一離心管中，加入 PBS 至 4 ml 混合均勻，先取出 100 ul 計算細胞數再離心，倒出上清液後，把底層離心物打散，再加 PBS 至 4 ml，共清洗二次(1200 rpm，5 min)。每個樣本需要 5×10^5 個細胞數，將最後離心的產物去除上清液，加入 PBS 至 4 ml，取出實驗所需的量至 1.5 ml 避光褐色管。

取下之前 NMA 的蓋玻片，待 slide 回溫，在避光褐色管加入 1 ml 1 % Low melting point agarose (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°C))。將 slide 放入 Lysis buffer 浸泡，於 4°C 冰箱冷藏一小時【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：21 V；300 mA；15 min【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 10 min

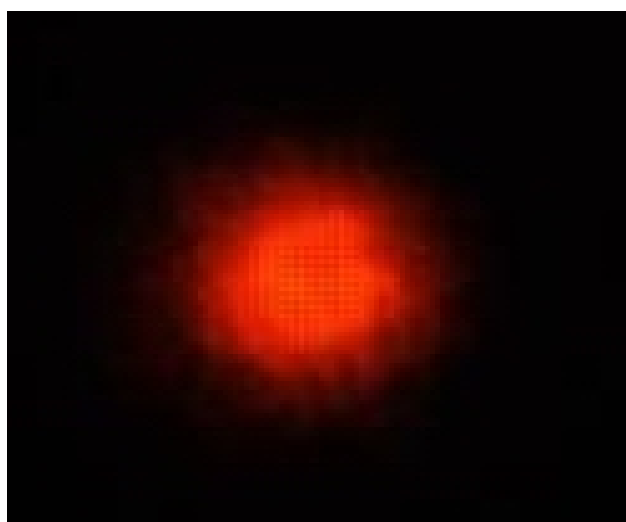
【固定細胞】(可保存大約一個月)，取出後晾乾(完全乾)，再滴上 40 μ l 的 PI (Propidium iodide) 染色，置於螢光顯微鏡觀察。

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 受損害程度分為 5 級⁽³⁸⁾：

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

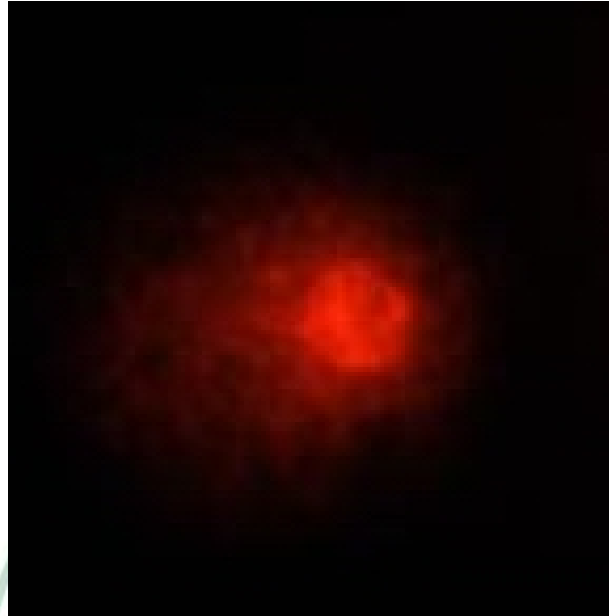


(2) 低程度傷害(low level damage)：彗星尾巴 DNA 含量佔 5-20%，彗星尾巴長度比頭部直徑短；



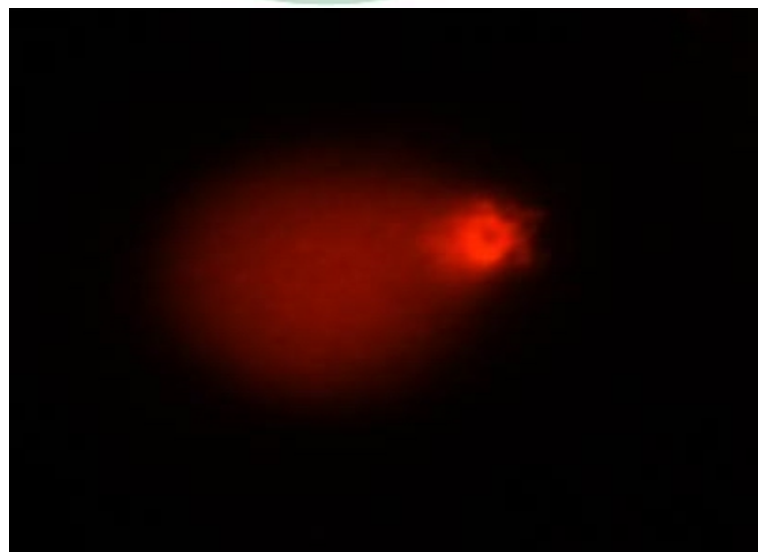
(3) 中度傷害(medium level damage)：彗星尾巴 DNA 含量佔 20-40%，

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(total 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 $\times 0$ + 低度傷害細胞數 $\times 1$ + 中度傷害細胞數 $\times 2$ + 高度傷害細胞數 $\times 3$ + 完全傷害細胞數 $\times 4$ = 個體 DNA 損傷總積分⁽⁴¹⁾。

四、統計方法

懷孕婦女個人問卷資料及各種檢體以 Excel 建檔，並以 SAS 8.0 版進行統計分析，其方法包括卡方檢定(χ^2 -test)、t 檢定、費雪精確檢定(Fisher's exact test)、變異數分析(ANOVA)及羅吉斯多變項迴歸分析等。並分析懷孕婦女 XRCC1、XRCC3、XPD 及 hMLH1 多型性基因與 DNA 損傷積分等變項之相關，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，利用羅吉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 聚合酶鏈鎖反應

1. Agarose (Promega, USA)
2. Ethidium bromide (Sigma, USA)
3. 1.5 mM 10X 聚合酶緩衝液 (Protech, Taiwan)
4. 2.5 mM 去氧核苷三磷酸 (dNTP) (Protech, Taiwan)
5. 100 uM 10X primer (Mission Biotech, Taiwan)
6. 2U/ul Taq 聚合酶 (Taq polymerase) (Protech, Taiwan)
7. Msp I restriction enzyme (New England Biolabs, USA)

8. Nla III restriction enzyme (New England Biolabs, USA)
9. Mbo II restriction enzyme (New England Biolabs, USA)
10. Pvu II restriction enzyme (New England Biolabs, USA)
11. RE 10X buffer (Biolabs, USA)
12. 100 bp ladder (Protech, Taiwan)
13. 1X TBE buffer (Amresco)

(3) 彗星試驗

1. Agarose
 - a. Normal melting point agarose (1% NMA) (Amresco)
 - b. Low melting point agarose (1% LMA) (Amresco)
2. Lysis solution
 - a. 10 mM Tris (Merck, Taiwan)
 - b. Eethylene diaminete traacetic acid (EDTA) disodium salt (Merck, Taiwan)
 - c. 2.5 M NaCl (Merck, Taiwan)
 - b. 1% (V/V) Triton X-100 (ICN Biomedicals)
3. Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) (Merck, Taiwan)
4. Trypan blue (Sigma, USA)
5. Histopauqe 1077 (Sigma, USA.)

6. Phosphate buffered saline (PBS) CaCl₂ and MgCl₂ free (Sigma, USA)
7. Electrophoresis solution : pH > 13
 - a. 1 mM Na₂EDTA (Merck, Taiwan)
 - b. 300 mM NaOH (Merck, Taiwan)
8. Distilled water
9. Propidium iodide (40 μ PI) (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. 15 ml 離心管 (IWAKI)
5. 燒杯 (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml) (Schott Duran)
6. 乳頭吸管 (Merck, Taiwan)
7. 量筒 (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml) (Sibata)
8. 試管架 (Bohlender)
9. Reach pipet tips (白、黃、藍) (SSI, USA)
10. 微量離心管 (0.2 ml, 0.6 ml, 1.5 ml) (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°C 雙門冰箱 (Whirlpool)

3. 恆溫水浴槽 (Firstek)

4. PCR 機器 (Eppendorf)

5. -20°C 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 EDAS290 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、懷孕婦女之基本資料分析

全體的懷孕婦女平均年齡是 29.8 歲，分組後年齡在吸菸組為 28.3 歲，二手菸組為 29.2 歲，非吸菸組為 30.7 歲，吸菸者的年齡比二手菸及非吸菸者的年齡稍低。在喝酒與喝咖啡的習慣，95.3% 的孕婦沒有喝酒習慣，90.6% 沒有喝咖啡的習慣，但是在吸菸組中有較多人同時具有喝酒習慣 (31%)。在教育程度方面，吸菸組中有 76.5% 是高中或高中以下；然而非吸菸組中有較多人是大學或大學以上 (40.2%)。在職業方面，非家庭主婦即代表職業婦女，遭受二手菸暴露的人數較多。有關家庭的月收入，吸菸組中以四萬元以下的最多 (43.8%)，收入的分布在二手菸組與非吸菸組中則較相近。三組的年齡、喝酒習慣、教育程度、職業、家庭月收入具有顯著差異 ($p < 0.05$)。孕婦懷孕史的資料，有是否為第一胎、是否曾經自然流產及有無生產合併症，在吸菸組中有較多人有自然流產的經驗，且在三組的分布具有顯著差異 ($p < 0.05$)。有關個人及家族的疾病史方面，有高血壓、糖尿病、癌症、遺傳疾病及其他這些資料，在本次的研究族群中，有疾病狀態的人數較少，進行卡方檢定及費雪經確定檢定後三組的分布沒有統計差異。以上有關孕婦基本資料如表一所示。

比較三組孕婦，吸菸組與非吸菸組在年齡、喝酒習慣、教育程度、家庭月收入、個人糖尿病這些變項中具有顯著差異 ($p < 0.05$)；二手菸組與非吸菸組在年齡、教育程度、職業、家族高血壓這些變項中亦有顯著差異 ($p < 0.05$)。

二、孕婦之可丁寧濃度與 DNA 損傷程度分析

表二為孕婦血液、尿液可丁寧及 DNA 損傷程度分析，全體孕婦血液中可丁寧平均濃度是 0.93 ng/ml，在吸菸組為 2.11 ng/ml，二手菸組為 1.02 ng/ml，非吸菸組為 0.62 ng/ml。全體孕婦尿液中可丁寧平均濃度是 1.92 ng/ml，在吸菸組為 2.36 ng/ml，二手菸組為 2.25 ng/ml，非吸菸組為 1.42 ng/ml。尿液及血液中的可丁寧濃度均隨著非吸菸、二手菸、吸菸之暴露程度增加而有上升的趨勢，且在三組間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

全體孕婦的 DNA 損傷積分平均值是 85.1，比較三組的損傷程度，在吸菸組為 77.7，二手菸組為 83.4，非吸菸組為 65.2；發現吸菸組與二手菸組的 DNA 損傷程度皆比非吸菸組高，而且，以二手菸組為最高，三組的損傷程度具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

比較三組孕婦，吸菸組與非吸菸組在血液、尿液可丁寧濃度這些變項中具有顯著差異 ($p < 0.05$)；二手菸組與非吸菸組在血液、尿液可丁寧濃度、DNA 損傷程度這些變項中皆有顯著差異 ($p < 0.05$)。

三、四種修補基因之對偶基因及基因型分析

懷孕婦女修補基因型的分佈頻率如表三所示。XRCC1 基因型分布頻率在全體孕婦中 Arg / Arg (野生型) 為 48.4%、Arg / Gln (野生變異型) 44.8%、Gln / Gln (變異型) 6.8%；另外，在吸菸組當中三種基因型頻率各為 41.2%、58.8%、0%，在二手菸組各為 51.4%、40.2%、8.4%，非吸菸組各為 46.4%、47.4%、6.2%。

XRCC3 基因型分布頻率在全體孕婦中 Thr / Thr(野生型) 為 96.0%、Thr / Met(野生變異型) 4.0%，在此次研究對象中並無發現 Met / Met(變異型) 的人；吸菸組的二種基因型頻率各為 94.1%、5.9%，二手菸組各為 95.9%、4.1%，非吸菸組各為 96.4%、3.6%。

XPD 基因型分布頻率在全體孕婦中 Lys / Lys (野生型) 為 85.7%、Lys / Gln (野生變異型) 13.9%、Gln / Gln (變異型) 0.4%；三種基因型頻率在吸菸組中各為 88.2%、11.8%、0%，二手菸組各為 84%、16.1%、0%，非吸菸組各為 89.2%、11.8%、1%。

hMLH1 基因型分布頻率在全體孕婦中 G / G (野生型) 為 10.5%、G / A (野生變異型) 69.2%、A / A (變異型) 20.3%；分組之後，三種基因型頻率在吸菸組中各為 5.9%、70.6%、23.5%，二菸組各為 12.7%、73.7%、13.6%，非吸菸組各為 8.8%、63.7%、27.5%。以上四種修補基因型分佈均未達到統計上顯著意義，對偶基因頻率經由 χ^2 -檢定均無統計上顯

著差異，且基因型分佈頻率皆有符合哈一溫平衡定律（Hardy-Weinberg Equilibrium）。

四、孕婦吸菸狀態及其修補基因型與 DNA 損傷程度之分析（表四）

比較不同吸菸狀態與基因型別之 DNA 損傷積分。在吸菸組中，XRCC1 Arg / Arg 基因型者之 DNA 損傷積分為 68.6，XRCC1 Arg / Gln 或 Gln / Gln 基因型為 84.1；XRCC3 Thr / Thr 基因型為 72.8，XRCC3 Thr / Met 基因型為 157.0；XPD Lys / Lys 基因型為 75.5，XPD Lys / Gln 或 Gln / Gln 基因型為 94.0；hMLH1 G / G 基因型為 58.0，G / A 基因型為 76.8，A / A 基因型為 85.5，吸菸組中帶有任一個修補基因變異型之 DNA 損傷程度都比野生型高，但並無統計顯著差異。

二手菸組之 XRCC1 Arg / Arg 基因型為 77.3，XRCC1 Arg / Gln 或 Gln / Gln 基因型為 91.5；XRCC3 Thr / Thr 基因型為 84.6，XRCC3 Thr / Met 基因型為 80.0；XPD Lys / Lys 基因型為 84.5，XPD Lys / Gln 或 Gln / Gln 基因型為 77.7；hMLH1 G / G 基因型為 63.8，G / A 基因型為 85.1，A / A 基因型為 92.3，二手菸組的 XRCC1、hMLH1 基因帶有變異型之 DNA 損傷程度會比野生型高，但並無統計顯著差異。

而在非吸菸組中，XRCC1 Arg / Arg 基因型為 61.7，XRCC1 Arg / Gln 或 Gln / Gln 基因型為 65.4；XRCC3 Thr / Thr 基因型為 66.4，XRCC3 Thr

/Met 基因型為 73.3；XPD Lys / Lys 基因型為 66.5，XPD Lys / Gln 或 Gln / Gln 基因型為 56.5；hMLH1 G / G 基因型為 40.6，G / A 基因型為 66.6，A / A 基因型為 69.8，非吸菸組的 XRCC1、XRCC3 與 hMLH1 基因帶有變異型之 DNA 損傷程度會比野生型高，但並無統計顯著差異。

比較三組孕婦，以二手菸組中帶有任一個修補基因變異型之 DNA 損傷程度皆比非吸菸者高，且達到統計上顯著意義 ($p < 0.01$)。

五、修補基因型與 DNA 損傷程度之相關性分析 (表五)

以 DNA 損傷積分的中位數 (median = 68) 作為分組，分為高損傷程度與低損傷程度，比較不同基因型對 DNA 損傷程度的影響，修補基因 hMLH1 A/A 或 G/A 基因型之 DNA 損傷程度是 G/G 基因型的 2.83 倍，且達到統計上顯著意義 (OR = 2.83 ; 95% CI : 1.13—7.05)，調整年齡、血液及尿液可丁寧濃度、喝酒習慣、香菸暴露狀態等變項後，亦達到統計上顯著意義 (aOR = 3.49 ; 95% CI : 1.32—9.24)。

六、修補基因變異個數對 DNA 損傷程度之分析 (表六)

四種修補基因隨著各基因之變異型數目增加，DNA 損傷程度會增加，當孕婦單一個修補基因帶有變異型時，其 DNA 損傷積分在吸菸組為 68.6，二手菸組為 74.0，非吸菸組為 64.3，吸菸組與二手菸組皆比非吸菸組高；當帶有二個或以上修補基因變異型者，其 DNA 損傷積分在吸菸組

為 84.1，二手菸組為 96.0，非吸菸組為 69.4，吸菸組與二手菸組皆比非吸菸組高，且在二手菸組顯著高於非吸菸組 ($p = 0.002$)。

特別是在二手菸暴露下，孕婦帶有二個或以上變異型修補基因之 DNA 損傷積分為 96.0，比帶有單一個變異型 74.0 高，並且達到統計上顯著意義 ($p = 0.021$)。

七、可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性分析

分析懷孕婦女血液及尿液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性，表七為血液可丁寧濃度與 DNA 損傷程度，表八為尿液可丁寧濃度與 DNA 損傷程度，均依照吸菸狀態分組做探討，三組的血液及尿液可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性低，三組的 R^2 值皆小於 0.5，並將血液及尿液可丁寧濃度依第二十五百分位、第五十百分位、第七十五百分位的切點分四組，看 DNA 損傷程度的分布是否有差異，經由卡方檢定及費雪精確檢定均無統計上顯著意義，亦將血液及尿液可丁寧濃度依第五十百分位的切點分二組，進行卡方檢定及費雪精確檢定，亦無統計上顯著意義。

由以上分析結果得知孕婦血液及尿液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性很低，故無法利用血液或尿液中可丁寧的濃度，預測孕婦的 DNA 損傷程度。

第五章 討論

本研究首次探討台灣地區暴露於菸害孕婦之 DNA 修補酵素基因多型性和 DNA 損傷之相關性。研究對象由台中地區三所公私立醫院收集懷孕婦女之問卷資料及血液、尿液樣本進行分析，並依照其問卷調查之吸菸暴露狀態做為分組，分為吸菸組、二手菸組、非吸菸組共有 237 名懷孕婦女的資料可供分析。比較孕婦基本資料後，顯示本次研究對象中有吸菸習慣者其年齡較低、同時具有喝酒習慣、教育程度較低、家庭月收入較低。在 Wang 等人⁽⁷⁾的研究中，發現懷孕婦女吸菸者同時有喝酒習慣、教育程度較低，與非吸菸者有顯著差異 ($p < 0.01$)。DeLorenze 等人⁽²⁶⁾的研究結果亦顯示孕婦遭受較多的二手菸暴露其年齡較低、教育程度較低、且接受政府補助的人較多。

雖然台灣女性抽菸比例不高，本次參與研究的懷孕婦女中有 7.2% 有吸菸習慣，但是抽菸仍是造成 DNA 損傷的重要危險因子。本研究和過去研究同樣發現，DNA 損傷程度和香菸暴露有密切相關⁽¹¹⁾。Hoffmann 等人⁽⁴²⁾利用整合分析 (meta-analysis) 調查香菸暴露的影響發現，在 38 個相關的研究中都指出吸菸者之 DNA 損傷程度顯著高於非吸菸者，顯示香菸暴露是具有基因毒性的。但是，在 Speit 等人⁽²³⁾利用彗星實驗測量 DNA 損傷的研究中，發現吸菸者和非吸菸者之 DNA 損傷程度沒有顯著差異。

由於香菸暴露量難以估計，可能會造成錯誤分組而低估了 DNA 損傷的程度，而本研究中的懷孕婦女依自填式問卷做為分組，可能因為想隱瞞自己吸菸的實情，或是每個人對菸味的敏感度不同，亦會造成錯誤分組的情形。DeLorenze 等人⁽²⁶⁾ 探討孕婦之二手菸暴露情況在自填式問卷與血清可丁寧之間的相關性，發現血清中可丁寧濃度和二手菸暴露時間具有相關性 ($r=0.38; p < 0.001$)，回答有吸菸者其體內可丁寧濃度較回答非吸菸者高。與本研究結果相似，血液可丁寧濃度在吸菸組為 2.11 ng/ml，二手菸組為 1.02 ng/ml，非吸菸組為 0.62 ng/ml，而尿液可丁寧濃度在吸菸組為 2.36 ng/ml，二手菸組為 2.25 ng/ml，非吸菸組為 1.42 ng/ml，尿液及血液中的可丁寧濃度均隨著非吸菸、二手菸、吸菸之暴露程度增加而有上升的趨勢，且吸菸組與二手菸之血液、尿液中可丁寧濃度皆顯著高於非吸菸組 ($p < 0.05$)。然而，在本研究中仍然可以看到吸菸組和二手菸組之 DNA 損傷程度皆比非吸菸者之 DNA 損傷程度高，且二手菸組之 DNA 損傷程度顯著高於非吸菸者 ($p < 0.001$)，本研究結果發現以二手菸組之 DNA 損傷程度最為嚴重。

修補基因之基因多型性，亦會造成 DNA 損傷程度在個體間易感受性不同⁽³³⁾。DNA 修補酵素系統包括了鹼基切除修補、同源雙股 DNA 修補、核苷酸切除修補、錯誤配對修補，各自負責修補不同類型的受損 DNA^(18, 29)。目前並無任何文獻明確指出香菸暴露所造成的 DNA 損傷類型以及負

責修補的酵素系統^(43,44)，許多有關 DNA 修補酵素基因多型性和 DNA 損傷之相關性的研究結果並不一致^(16, 17, 18, 20, 28, 37, 45)。本研究乃廣泛地針對各類修補酵素系統加以探討，發現吸菸組中帶有任一個修補基因變異型之 DNA 損傷程度都會比野生型高；亦發現修補基因 hMLH1 之多型性（promoter G to A）與 DNA 損傷程度具有相關性，但在 XRCC1（Arg399Gln）、XRCC3（Thr241Met）、XPD（Lys751Gln）基因中則無發現此相關性存在。因此，hMLH1 基因變異型可能調控吸菸或二手菸的暴露狀態與 DNA 損傷程度之間的相關性。比較其他的研究結果，Hoffmann 等人⁽¹⁸⁾ 使用彗星實驗測量 DNA 損傷程度，在吸菸者和非吸菸者之 XRCC1（Arg399Gln）、XRCC3（Thr241Met）、XPD（Lys751Gln）基因與 DNA 損傷程度之間並未發現相關性存在。Lei 等人⁽¹⁶⁾ 使用姐妹染色分體交換頻率作為 DNA 損傷程度的指標，發現吸菸者其姐妹染色分體交換頻率顯著高於非吸菸者（8.4 vs. 7.1； $p < 0.05$ ），在重度吸菸者中帶有 XRCC1 Gln / Gln 或 Arg / Gln 基因型者之姐妹染色分體交換頻率顯著高於 Arg / Arg 基因型的人（9.0 vs. 7.9； $p < 0.05$ ），且香菸暴露和 XRCC1（Arg399Gln）基因型之交互作用與姐妹染色分體交換頻率之間具有相關性（ $p = 0.02$ ）。

Park 等人⁽⁴⁵⁾ 發現 XRCC1 Gln 對偶基因與肺癌風險有關，且帶有 Gln / Gln 基因型者得到癌症風險是 Arg / Arg 基因型者的 3.26 倍。Lei 等人⁽¹⁶⁾

針對台灣人所做的研究中發現 XRCC1 Gln / Gln 基因型分布在吸菸組為 3.2%，非吸菸組為 10%，XRCC1 Gln 對偶基因頻率，在吸菸組為 0.28，非吸菸組為 0.26。其 XRCC1 基因型分布與本研究結果相似，XRCC1 Gln / Gln 基因型分布在吸菸組為 0%，二手菸組為 8.4%，非吸菸組為 6.2%，XRCC1 Gln 對偶基因頻率，在三組中皆為 0.29。而 Yu 等人⁽⁴⁶⁾調查中國人 XRCC1 Gln 對偶基因頻率是 0.28。

Kiuru 等人⁽¹⁷⁾使用染色體變異頻率作為 DNA 損傷程度的指標，發現帶有 XRCC3 帶有 Met / Met 基因型者之染色體異常頻率高於 Thr / Thr 基因型者，但並無顯著差異，且發現 XRCC3 基因與染色體異常頻率之間具有相關性存在 ($p = 0.028$)。Angelini 等人⁽³⁷⁾使用微核發生頻率當作 DNA 損傷程度指標，發現 XRCC1 Gln / Gln 或 Arg / Gln 基因型和 XRCC3 Met / Met 或 Thr / Met 基因型者之微核發生頻率高於 XRCC1 Arg / Arg 和 XRCC3 Thr / Thr 基因型者，但並無顯著差異，且發現抽菸狀態對微核發生頻率沒有影響。吳等人⁽²⁸⁾發現 XRCC3 Met 對偶基因與肺癌風險有關，且帶有 Thr / Met 基因型者得到肺癌風險是野生型的 2.08 倍。但是在本次收集的研究對象中並沒有發現 XRCC3 Met / Met 基因型的人，XRCC3 Thr / Met 基因型在吸菸組為 5.9%，二手菸組為 4.1%，非吸菸組為 3.6%，XRCC3 Met 對偶基因頻率，在吸菸組為 0.03，二手菸組為 0.02，非吸菸組為 0.02。吳等人⁽²⁸⁾調查台灣人 XRCC3 Met 對偶基因頻率是 0.03。而

Yeh 等人⁽⁴⁷⁾調查台灣人 XRCC3 Met 對偶基因頻率為 0.05。Misra 等人⁽⁴⁸⁾調查芬蘭人 XRCC3 Met 對偶基因頻率為 0.29。對偶基因頻率在不同種族間可能具有差異性存在⁽³³⁾。

Vodicka 等人⁽¹⁹⁾利用染色體異常頻率測量 DNA 損傷程度，發現吸菸者之 DNA 損傷程度比非吸菸者高，且當修補基因 XPD 帶有 Gln / Gln 或 Lys / Gln 基因型之 DNA 損傷程度比 Lys / Lys 基因型高，但是在 XRCC1 (Arg399Gln) 基因和 XRCC3 (Thr241Met) 基因中沒有發現這樣的差異性存在。吳等人⁽²⁸⁾發現 XPD Gln 對偶基因與肺癌風險有關，且帶有 Gln / Gln 基因型者得到肺癌風險是 Lys / Lys 基因型的 16.1 倍。在本研究中 XPD Gln / Gln 基因型只有在吸菸組為 1%，二手菸組和非吸菸組為 0%，XPD Gln 對偶基因頻率，在吸菸組為 0.06，二手菸組為 0.08，非吸菸組為 0.07。Yeh 等人⁽⁴⁷⁾調查台灣人 XPD Gln 對偶基因頻率為 0.07。而 Xing 等人⁽⁴⁹⁾調查中國人 XPD Gln 對偶基因頻率是 0.07。Misra 等人⁽⁴⁸⁾調查芬蘭人 XPD Gln 對偶基因頻率為 0.41。XPD Gln 對偶基因頻率亦可能具有種族差異性。

Park 等人⁽²⁰⁾發現 hMLH1 (promoter G to A) 帶有 A / A 基因型得到肺癌的風險是 G / G 或 G / A 基因型的 1.57 倍。吳等人⁽²⁸⁾發現 hMLH1 A 對偶基因與肺癌風險有關，且帶有 A / A 基因型者得到肺癌風險是 G/G 基因型的 3.65 倍。在本研究中 hMLH1 A / A 基因型在吸菸組為 23.5%，二

手菸組為 13.6%，非吸菸組為 27.5%，hMLH1 A 對偶基因頻率，在吸菸組為 0.59，二手菸組為 0.50，非吸菸組為 0.59。吳等人⁽²⁸⁾調查台灣人 hMLH1 A 對偶基因頻率是 0.62。Ito 等人⁽³²⁾調查日本人 hMLH1 A 對偶基因頻率為 0.46。

目前已有許多測量 DNA 損傷的方法⁽³⁶⁾，其中彗星試驗是一種快速、簡便的方法，近來已被廣泛使用測量香菸所引起的 DNA 損傷^(23,38)，過去有研究利用彗星試驗發現，吸菸者之 DNA 損傷程度比非吸菸者較高，但是並未發現到 XRCC1、XRCC3 和 XPD 多型性基因與 DNA 損傷程度具有相關性存在⁽¹⁸⁾。本研究中僅發現修補基因 hMLH1 之多型性與 DNA 損傷程度具有相關性存在，但在 XRCC1、XRCC3、XPD 基因中並無此發現。目前並沒有其他有關 hMLH1 之基因多型性與 DNA 損傷程度相關性的研究。Deng 等人⁽⁵⁰⁾發現 hMLH1 啟動子的甲基化會導致蛋白質無法表現。然而，此核酸突變發生在啟動子之重要位置上，目前已知此多型性位置與遺傳性非息肉性結腸癌有關⁽³²⁾。在本研究發現 hMLH1 之基因多型性與 DNA 損傷程度有關。

在吳等人⁽²⁸⁾調查台灣女性肺腺癌與環境遺傳交互作用的研究中，將 DNA 修補酵素危險基因型數目分組探討，發現隨著環境和遺傳危險因子的增加，其罹患肺腺癌的危險性也會增加。本研究中除了探討基因單獨的作用外，也依照四個修補酵素之變異基因型數目分成兩組，以評估變

異基因型數目和香菸暴露狀態對於 DNA 損傷程度的影響。結果顯示隨著危險因子增加，其 DNA 損傷程度也會增加，以遭受二手菸的暴露狀態下，個體帶有二個或以上變異型修補基因之 DNA 損傷程度為最高，且達到統計上顯著意義 ($p = 0.021$)，顯示其具有較多的外在暴露或是修補基因變異型之 DNA 損傷程度會增加。

本研究中亦探討懷孕婦女血液及尿液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性，由結果顯示可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性很低，故無法利用血液或尿液中可丁寧的濃度，預測懷孕婦女之 DNA 損傷程度。在 Collier 等人⁽⁵¹⁾的研究中發現血液可丁寧濃度與 DNA 損傷程度具有相關性 ($p = 0.0042$)，將研究對象分組後，在暴露於二手菸的女性中此相關性不存在 ($p = 0.736$)，但在男性中則具有相關性 ($p = 0.015$)。

未來在探討遺傳易感受性和 DNA 損傷程度之相關性研究，應該考慮到更多基因群，例如致癌物質的代謝基因或是荷爾蒙相關基因，基因與基因之間的交互作用，同時評估各個變異基因型與各項環境危險因子之間的交互作用，可能較能夠了解 DNA 修補酵素基因多型性和 DNA 損傷程度之相關性。

第六章 結論

本研究首次探討暴露於菸害孕婦之 DNA 修補酵素基因多型性和 DNA 損傷之相關性。結果發現暴露於二手菸或吸菸的孕婦所誘發的 DNA 損傷比非吸菸者高，與過去研究結果同樣發現香菸暴露具有基因毒性。hMLH1 基因型可能調控吸菸或二手菸的暴露狀態與 DNA 損傷程度之間的相關性。特別是在遭受到二手菸的暴露狀態下，個體修補基因同時帶有變異型之 DNA 損傷程度，顯著高於帶有單一個變異型修補基因的人。吸菸或二手菸暴露且帶有修補基因變異型的孕婦對 DNA 損傷可能具有加成作用。另外分析可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性，無發現相關性存在。

第七章 參考文獻

1. Mackay J, Eriksen M: The Tobacco Atlas. World Health Organization 2002.
2. Kilbane S, Knudtson E, Vesha K: Smoking cessation in women. Prim. Care Update Ob Gyns. 2002; 9: 164-168.
3. 張鳳琴、張晞雁、劉夏園、吳聖良：民國九十一年台灣地區健康促進知識、態度與行為調查。行政院衛生署國民健康局 2002 年。
4. CDC: Smoking during pregnancy—United States, 1990-2002. JAMA. 2004; 292: 2206-2208.
5. 林陳立、吳慧娜：懷孕期婦女與配偶吸菸對周產期健康與死亡之影響。行政院衛生署國民健康局 2003 年。
6. Siener K, Malarcher A, Husten C: Women and smoking: patterns, health effects, and treatments. Prim. Care Update Ob Gyns. 2000; 7: 77-84.
7. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X: Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. JAMA. 2002; 287: 195-202.
8. Hecht SS: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J. Natl. Cancer Inst. 1999; 91: 1194-1210.
9. Pavanello S, Clonfero E: Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. Mutat. Res. 2000; 463: 285-308.
10. Wiencke JK: DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. Oncogene 2002; 21: 7376-7391.
11. DeMarini DM: Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke

- condensate: a review. *Mutat. Res.* 2004; 567: 447-474.
12. Wu X, Zhao H, Suk R, Christiani DC: Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* 2004; 23: 6500-6523.
 13. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD: Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002; 11: 1513-1530.
 14. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K: Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 2004; 25: 757-763.
 15. Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA: XRCC1 Polymorphisms: Effects on Aflatoxin B1-DNA Adducts and Glycophorin A Variant Frequency. *Cancer Res.* 1999; 59: 2557-2561.
 16. Lei YC, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Luo JC, Chang MJW, Cheng TJ: Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat. Res.* 2002; 519: 93-101.
 17. Kiuru A, Lindholm C, Heilimo I, Ceppi M, Koivistoinen A, Ilus T, Hirvonen A, Norppa H, Salomaa S: Influence of DNA repair gene polymorphisms on the yield of chromosomal aberrations. *Environ. Mol. Mutagen.* 2005; 46:198-205.
 18. Hoffmann H, Isner C, Hoegel J, Speit G : Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 2005; 20: 359-364.
 19. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Musak L, Soucek P, Haufroid V, Sasiadek

- M, Vodickova L, Naccarati A, Sedikova J, Sanyal S, Kuricova M, Brsiak V, Norppa H, Buchancova J, Hemminki K: Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant. *Environ. Mol. Mutagen.* 2004; 44: 283-92.
20. Park SH, Lee GY, Jeon HS, Lee SJ, Kim KM, Jang SS, Kim CH, Lee WK, Kam S, Park RW, Kim IS, Jung TH, Park JY: -93G-->A polymorphism of hMLH1 and risk of primary lung cancer. *Int. J. Cancer* 2004; 112: 678-682.
21. Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H: The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000; 9: 1005-1015.
22. Faust F, Kassie F, Knasmuller S, Boedeker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V: The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 2004; 566: 209-229.
23. Speit G, Witton-Davies T, Heepchantree W, Trenz K, Hoffmann H: Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat. Res.* 2003; 542: 33-42.
24. 董氏基金會：民國八十七年、八十九年菸害防治相關調查。
<http://www.jtf.org.tw/JTF06/06-02.htm>, 2006-05-11.
25. 行政院衛生署國民健康局：健康指標查詢。
<http://olap.bhp.doh.gov.tw/index.htm>, 2006-05-11.
26. DeLorenze GN, Kharrazi M, Kaufman FL, Eskenazi B, Bernert JT: Exposure to environmental tobacco smoke in pregnant women: The

- association between self-report and serum cotinine. *Environ. Res.* 2002; 90: 21-32.
27. Dempsey D, Jacob P, Benowitz NL: Accelerated metabolism of nicotine and cotinine in pregnant smokers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 301: 594-598.
28. 吳慧真、廖國盟、黃百婉、翁祖輝、楊泮池、陳建仁：菸煙及油煙暴露與 DNA 修補酵素基因多型性對台灣北部女性肺腺癌之交互作用。台灣公共衛生雜誌 2001；20：357-364。
29. Mohrenweiser HW, Xi T, Va'zquez-Matías J, Jones IM: Identification of 127 amino acid substitution variants in screening 37 DNA repair genes in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002; 11: 1054-1064.
30. Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q: Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 1354-1357.
31. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H: Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 1998; 58: 604-608.
32. Ito E, Yanagisawa Y, Iwahashi Y, Suzuki Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Sugano S, Yuasa Y, Maruyama K: A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene hMLH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 256: 488-494.
33. Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM: Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer* 2002; 37: 241-256.

34. Hecht SS: DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat. Res.* 1999; 424: 127-142.
35. Perera FP, Tang D, Tu YH, Cruz LA, Borjas M, Bernert T, Whyatt RM: Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage. *Environ. Health Perspect.* 2004; 112: 1133-1136.
36. Henderson LM, Speit G: Review of the genotoxicity of styrene in humans. *Mutat. Res.* 2005; 589: 158-91.
37. Angelini S, Kumar R, Carbone F, Maffei F, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Curti S, Hemminki K, Hrelia P: Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat. Res.* 2005; 570: 105-17.
38. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P: The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 1994; 307: 261-271.
39. 吳芳鵞、賴俊雄、郭憲文、林綽娟等：吸菸或二手菸影響懷孕期、生產期女性之健康研究。行政院衛生署國民健康局 2003 年。
40. Poli P, Buschini A, Spaggiari A, Rizzoli V, Carlo-Stella C, Rossi C: DNA damage by tobacco smoke and some antiproliferative drugs evaluated using comet assay. *Toxicol. Lett.* 1999; 108: 267-276.
41. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 1995; 336: 69-77.
42. Hoffmann H, Hogel J, Speit G: The effect of smoking on DNA effects in

- the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2005; 20: 455-466.
43. Speit G, Hartmann A: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Meth Mol. Biol.* 2005; 291: 85-95.
44. Collins AR: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 249-261.
45. Park JY, Lee SY, Jeon HS, Bae NC, Chae SC, Joo S, Kim CH, Park JH, Kam S, Kim IS, Jung TH: Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002; 11: 23-27.
46. Yu HP, Zhang XY, Wang XL, Shi LY, Li YY, Li F, Su YH, Wang YJ, Lu B, Sun X, Lu WH, Xu SQ: DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. *Cancer Detect. Prev.* 2004; 28: 194-199.
47. Yeh CC, Sung FC, Tang R, Chang-Chieh CR, Hsieh LL: Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3, & XPD genes, and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. *BMC Cancer* 2005; 5: 12.
48. Misra RR, Ratnasinghe D, Tangrea JA, Virtamo J, Andersen MR, Barrett M, Taylor PR, Albanes D: Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland. *Cancer Lett.* 2003; 191: 171-178.
49. Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D: Polymorphisms of the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer* 2002; 38: 123-129.
50. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res.* 1999; 59: 2029-2033.

51. Collier AC, Dandge SD, Woodrow JE, Pritsos CA: Differences in DNA-damage in non-smoking men and women exposed to environmental tobacco smoke (ETS). *Toxicol. Lett.* 2005; 158: 10-19.



表一 懷孕婦女之基本資料

變項	吸菸	二手菸	非吸菸
人數	17	118	102
年齡 (年) (±SD)	28.3±4.3 ^{a*}	29.2±4.3 ^{b**}	30.7±3.8
BMI (kg/m ²) (±SD)	20.3±2.5	21.3±3.1	21.1±2.9
喝酒習慣 (%)			
無	11 (68.8) ^{a***}	111 (95.7)	101 (99.0)
有	5 (31.3)	5 (4.3)	1 (1.0)
喝咖啡習慣 (%)			
無	16 (94.1)	103 (88.8)	94 (92.2)
有	1 (5.9)	13 (11.2)	8 (7.8)
教育程度 (年) (%)			
高中或以下	13 (76.5) ^{a***}	57 (48.3) ^{b***}	22 (21.6)
五專	1 (5.9)	48 (40.7)	39 (38.2)
大學或以上	3 (17.7)	13 (11.0)	41 (40.2)
職業 (%)			
家庭主婦	7 (46.7)	33 (28.7) ^{b*}	42 (41.6)
非家庭主婦	8 (53.3)	82 (71.3)	59 (58.2)
家庭月收入 (元) (%)			
≤40000	7 (43.8) ^{a*}	25 (22.1)	12 (12.2)
40001~60000	5 (31.3)	37 (32.7)	31 (31.6)
60001~80000	2 (12.5)	27 (23.9)	24 (24.5)
>80000	2 (12.5)	24 (21.2)	31 (31.6)
是否為第一胎 (%)			
否	7 (41.2)	55 (46.6)	44 (43.6)
是	10 (58.8)	63 (53.4)	57 (56.4)
是否曾經自然流產 (%)			
否	7 (58.3)	95 (85.6)	75 (76.5)
是	5 (41.7)	16 (14.4)	23 (23.5)
有無生產合併症 ^ψ (%)			
無	6 (85.7)	44 (89.8)	33 (76.7)
有	1 (14.3)	5 (10.2)	10 (23.3)
個人疾病史 (%)			
高血壓			
無	15 (100)	111 (100)	97 (99.0)
有	0	0	1 (1.0)

續表一 懷孕婦女之基本資料

變項	吸菸	二手菸	非吸菸
糖尿病			
無	14 (93.3) ^{a*}	111 (100)	98 (100)
有	1 (6.7)	0	0
癌症			
無	15 (100)	111 (100)	96 (98.0)
有	0	0	2 (2.0)
遺傳疾病			
無	15 (100)	110 (99.1)	97 (99.0)
有	0	1 (0.9)	1 (1.0)
其他			
無	15 (100)	104 (93.7)	93 (94.9)
有	0	7 (6.3)	5 (5.1)
家族疾病史 (%)			
高血壓			
無	11 (73.3)	94 (83.2) ^{b*}	72 (72.0)
有	4 (26.7)	19 (16.8)	28 (20.0)
糖尿病			
無	12 (80.0)	90 (76.2)	81 (81.0)
有	3 (20.0)	28 (23.7)	19 (19.0)
癌症			
無	12 (80.0)	104 (92.0)	91 (91.0)
有	3 (20.0)	9 (8.0)	9 (9.0)
遺傳疾病			
無	14 (93.3)	113 (100)	98 (98.0)
有	1 (6.7)	0	2 (2.0)
其他			
無	15 (100)	110 (97.4)	98 (98.0)
有	0	3 (2.7)	2 (2.0)

^Ω 各變項中人數不足為遺漏值

^a 吸菸 vs. 非吸菸

^b 二手菸 vs. 非吸菸

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, t 檢定或 χ^2 -檢定

[∇] 合併症包含早期破水、胎盤早期剝離、羊水栓塞、子癲前症、早產、產程中大出血、胎兒窘迫、死胎及其他

表二 孕婦之可丁寧濃度與 DNA 損傷程度

變項	吸菸	二手菸	非吸菸
可丁寧濃度 (ng/ml)(±SD)			
血液	2.11±1.89 ^{a**}	1.02±1.81 ^{b*}	0.62±1.11
尿液	2.36±2.94 ^{a*}	2.25±3.15 ^{b*}	1.42±2.19
DNA 損傷積分 (±SD)	77.7±51.6	83.4±45.5 ^{b***}	65.2±34.9

^a 吸菸 vs. 非吸菸

^b 二手菸 vs. 非吸菸

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, t 檢定



表三 四種修補基因之對偶基因及基因型分析

變項	吸菸 n (%)	二手菸 n (%)	非吸菸 n (%)
XRCC1 (codon399)			
對偶基因頻率			
Arg	24 (70.6)	153 (71.5)	136 (70.1)
Gln	10 (29.4)	61 (28.5)	58 (29.1)
基因型分佈			
Arg / Arg	7 (41.2)	55 (51.4)	45 (46.4)
Arg / Gln	10 (58.8)	43 (40.2)	46 (47.4)
Gln / Gln	0(0)	9 (8.4)	6 (6.2)
XRCC3 (codon241)			
對偶基因頻率			
Thr	33 (97.1)	192 (98.0)	165 (98.2)
Met	1 (2.9)	4 (2.0)	3 (1.8)
基因型分佈			
Thr / Thr	16 (94.1)	94 (95.9)	81 (96.4)
Thr / Met	1 (5.9)	4 (4.1)	3 (3.6)
XPD (codon751)			
對偶基因頻率			
Lys	32 (94.1)	217 (91.9)	190 (93.1)
Gln	2 (5.9)	19 (8.1)	14 (6.9)
基因型分佈			
Lys / Lys	15 (88.2)	99 (84.9)	89 (89.2)
Lys / Gln	2 (11.8)	19 (16.1)	12 (11.8)
Gln / Gln	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)
hMLH1 (promoter)			
對偶基因頻率			
G	14 (41.2)	117 (49.6)	83 (40.7)
A	20 (58.8)	119 (50.4)	121 (59.3)
基因型分佈			
G / G	1 (5.9)	15 (12.7)	9 (8.8)
G / A	12 (70.6)	87 (73.7)	65 (63.7)
A / A	4 (23.5)	16 (13.6)	28 (27.5)

^Ω各變項中人數不足為遺漏值

[#]上表各基因型以 χ^2 -檢定均無達到顯著意義

表四 孕婦吸菸狀態及其修補基因型與 DNA 損傷程度之分析

變項	DNA 損傷積分(±SD) [§]					
	n	吸菸	n	二手菸	n	非吸菸
XRCC1 (codon399)						
Arg / Arg	7	68.6±47.5	55	77.3±43.0	45	61.7±33.4
Arg / Gln + Gln / Gln	10	84.1±55.8	52	91.5±48.6*	52	65.4±37.0
XRCC3 (codon241)						
Thr / Thr	16	72.8±48.9	94	84.6±45.1*	81	66.4±34.1
Thr / Met	1	157.0±0.0	4	80.0±34.8	3	73.3±48.0
XPD (codon751)						
Lys / Lys	15	75.5±48.7	99	84.5±46.2*	89	66.5±35.0
Lys / Gln + Gln / Gln	2	94.0±93.3	19	77.7±42.0	13	56.5±34.3
hMLH1 (promoter)						
G / G	1	58.0±0.0	15	63.8±46.0	9	40.6±23.7
G / A	12	76.8±54.4	87	85.1±45.6*	65	66.6±32.9
A / A	4	85.5±55.7	16	92.3±41.6	28	69.8±40.0

[§]個體的DNA損傷積分計算方式：(無傷害 × 0) + (低度傷害 × 1) + (中度傷害 × 2) + (高度傷害 × 3) + (完全傷害 × 4)

* 二手菸 vs. 非吸菸， $p < 0.01$ ，t檢定

表五 四種修補基因型與 DNA 損傷程度之相關性

變項	DNA 損傷積分		OR [†] (95% CI [‡])	aOR (95% CI)
	≤68	>68		
	n	n		
XRCC1 (codon399)				
Arg / Arg	57	50	1	1
Arg / Gln + Gln / Gln	53	61	1.312(0.773~2.227)	1.261(0.734~2.167)
XRCC3 (codon241)				
Thr / Thr	94	97	1	1
Thr / Met	4	4	0.969(0.235~3.988)	0.982(0.232~4.149)
XPD (codon751)				
Lys / Lys	99	104	1	1
Lys / Gln + Gln / Gln	20	14	0.666(0.319~1.392)	0.614(0.287~1.315)
hMLH1 (promoter)				
G / G	18	7	1	1
G / A + A / A	101	111	2.826(1.133~7.047) [*]	3.485(1.315~9.235) [*]

[†] OR: odds ratio

[‡] CI: confidence interval

^{*} $p < 0.05$

aOR: 調整年齡、血清可丁寧濃度、尿液可丁寧濃度、喝酒習慣、香菸暴露狀態

表六 修補基因變異個數對 DNA 損傷程度的影響

變異 個數	吸菸		二手菸		非吸菸		p^a	p^b
	n	(Mean±SD)	n	(Mean±SD)	n	(Mean±SD)		
≤1	7	(68.6±47.5)	44	(74.0±43.5)	35	(64.3±32.2)	0.771	0.279
≥2	10	(84.1±55.8)	45	(96.0±44.5)	46	(69.4±35.9)	0.297	0.002
p^c		0.558		0.021		0.513		

^a 吸菸 vs. 非吸菸，t 檢定

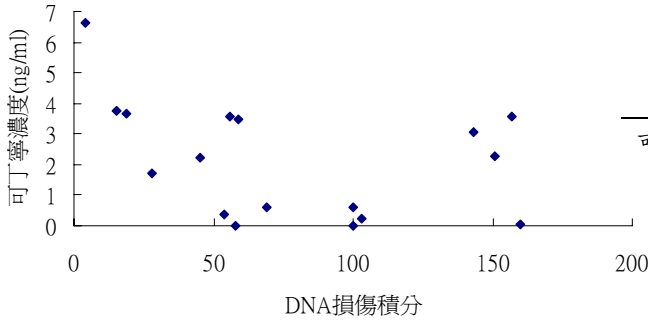
^b 二手菸 vs. 非吸菸，t 檢定

^c 變異個數 ≤ 1 vs. 變異個數 ≥ 2，t 檢定



表七 孕婦血液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性

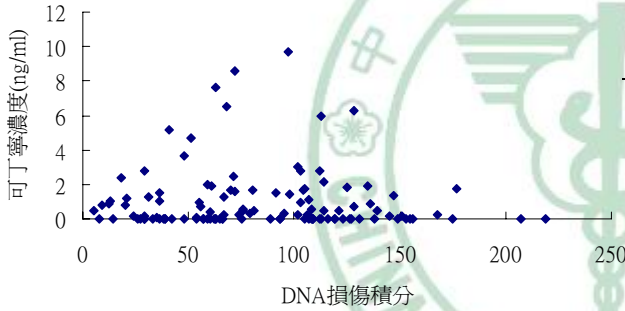
a. 吸菸組



	DNA 損傷積分		$p(\chi^2/\text{FET}^\#)$
	≤ 68	> 68	
可丁寧濃度(ng/ml)*	n (%)	n (%)	
$\leq Q 1$	1(11.1)	1(12.5)	0.3139/0.3020
$Q 2 \geq - > Q 1$	0	1(12.5)	
$Q 3 \geq - > Q 2$	1(11.1)	3(37.5)	
$> Q 3$	7(77.8)	3(37.5)	

§ 以 Q2 分二組， $p(\chi^2/\text{FET}^\#)=0.4534/0.5765$

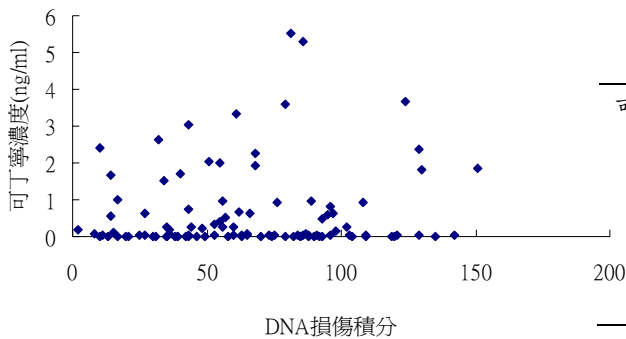
b. 二手菸組



	DNA 損傷積分		$p(\chi^2/\text{FET}^\#)$
	≤ 68	> 68	
可丁寧濃度(ng/ml)*	n (%)	n (%)	
$\leq Q 1$	16(30.7)	17(25.8)	0.6023/0.6112
$Q 2 \geq - > Q 1$	12(23.1)	11(16.7)	
$Q 3 \geq - > Q 2$	13(25.0)	18(27.3)	
$> Q 3$	11(21.2)	20(30.3)	

§ 以 Q2 分二組， $p(\chi^2/\text{FET}^\#)=0.2174/0.2662$

c. 非吸菸組



	DNA 損傷積分		$p(\chi^2/\text{FET}^\#)$
	≤ 68	> 68	
可丁寧濃度(ng/ml)*	n (%)	n (%)	
$\leq Q 1$	18(31.0)	15(34.1)	0.5763/0.5755
$Q 2 \geq - > Q 1$	13(22.4)	14(31.8)	
$Q 3 \geq - > Q 2$	16(27.6)	8(18.2)	
$> Q 3$	11(19.0)	7(15.9)	

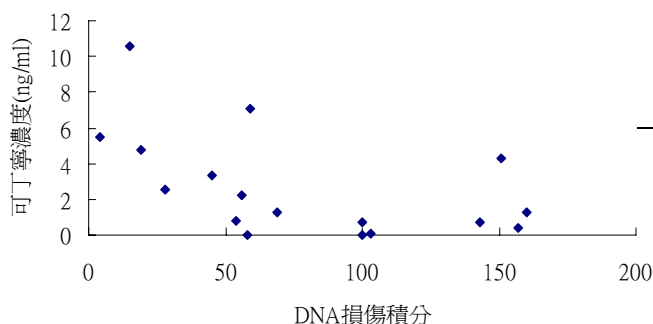
§ 以 Q2 分二組， $p(\chi^2/\text{FET}^\#)=0.2054/0.2285$

^\# FET=Fisher's Exact Test

* Q1=0.0178, Q2=0.1845, Q3=1.2488

表八 孕婦尿液中可丁寧濃度與 DNA 損傷程度之相關性

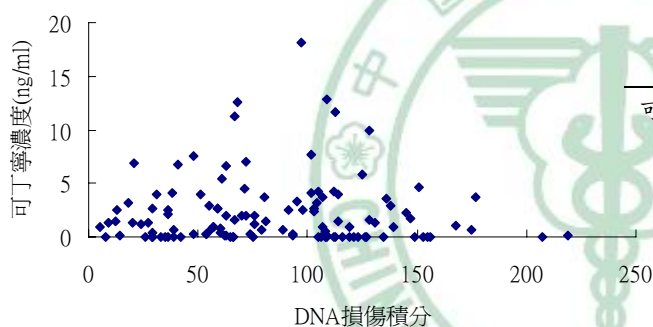
a. 吸菸組



	DNA 損傷積分		$p(\chi^2/\text{FET}^\#)$
	≤ 68	> 68	
可丁寧濃度(ng/ml)*	n (%)	n (%)	
$\leq Q 1$	1(11.1)	1(12.5)	0.2192/0.2254
$Q 2 \geq - > Q 1$	1(11.1)	4(50.0)	
$Q 3 \geq - > Q 2$	2(22.2)	2(25.0)	
$> Q 3$	5(55.6)	1(12.5)	

§ 以 Q2 分二組, $p(\chi^2/\text{FET}^\#)=0.0921/0.1534$

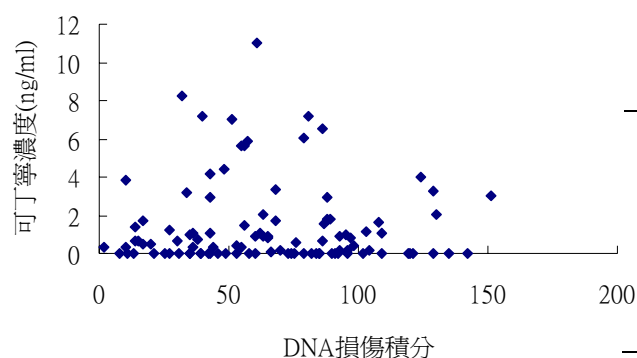
b. 二手菸組



	DNA 損傷積分		$p(\chi^2/\text{FET}^\#)$
	≤ 68	> 68	
可丁寧濃度(ng/ml)*	n (%)	n (%)	
$\leq Q 1$	10(19.2)	15(22.7)	0.7651/0.7779
$Q 2 \geq - > Q 1$	14(26.9)	13(19.7)	
$Q 3 \geq - > Q 2$	15(28.9)	18(27.3)	
$> Q 3$	13(25.0)	20(30.3)	

§ 以 Q2 分二組, $p(\chi^2/\text{FET}^\#)=0.6854/0.7122$

c. 非吸菸組



	DNA 損傷積分		$p(\chi^2/\text{FET}^\#)$
	≤ 68	> 68	
可丁寧濃度(ng/ml)*	n (%)	n (%)	
$\leq Q 1$	16(27.6)	18(40.9)	0.5422/0.5506
$Q 2 \geq - > Q 1$	16(27.6)	10(22.7)	
$Q 3 \geq - > Q 2$	13(22.4)	9(20.5)	
$> Q 3$	13(22.4)	7(15.9)	

§ 以 Q2 分二組, $p(\chi^2/\text{FET}^\#)=0.3897/0.4226$

FET=Fisher's Exact Test

* Q1=0.018, Q2=0.8017, Q3=2.6979