

# 中國醫藥大學

碩士論文

編號：IEH-1606

探討暴露於菸害之孕婦與其  
其新生兒 DNA 損傷及出生結果的相關性

The relationship among passive maternal smoking,  
newborn DNA damage and birth outcome

所 別：環境醫學研究所

指導教授：吳芳鶯 教授

吳宏達 助理教授

學 生：崔懷芝 Huai-Chih Tsui

學 號：9365006

中華民國 九十五年 六 月

# 目錄

目錄	I
圖表目錄	III
中文摘要	IV
英文摘要	V
第一章 前言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 婦女吸菸之盛行率	3
第二節 母親吸菸或暴露二手菸與新生兒出生結果的關聯性	3
第三節 可丁寧濃度與新生兒出生結果的相關	4
第四節 CYP2A6 基因多型性與可丁寧濃度	4
第五節 代謝基因多型性及新生兒出生結果	5
第六節 孕婦菸害暴露情形與新生兒 DNA 損傷的相關	7
第三章 材料與方法	8
第一節 研究架構	8
第二節 研究對象	8
第三節 基因型檢定	9
第四節 彗星試驗	13
第五節 統計分析	15

第六節	使用試劑及儀器	16
第四章	研究結果	18
第一節	基本人口學變項資料	18
第二節	探討孕婦菸害暴露情形、可丁寧濃度與新生兒出生結果的關係	19
第三節	新生兒基因型分佈頻率、DNA 損傷與出生結果之關係	22
第五章	討論	26
第一節	研究對象的特性	26
第二節	關於 CYP2A6 基因之頻率與其代謝能力	26
第三節	孕婦菸害暴露的情形與新生兒的出生結果	28
第四節	孕婦菸害暴露、新生兒代謝基因、DNA 損傷與出生結果的關係	28
第六章	結論	30
參考文獻		31
附錄		34

## 圖表目錄

表一 孕婦與新生兒之基本人口學資料	37
表二、CYP2A6 基因多型性與對偶基因之分布	39
表三、新生兒 CYP2A6 基因與臍帶血可丁寧濃度之相關	40
表四、孕婦菸害暴露情形與新生兒出生結果之迴歸分析	41
表五、四種代謝基因多型性之分布	42
表六、孕婦菸害暴露與新生兒 DNA 損傷積分之比較	43
表七、孕婦菸害暴露與新生兒彗星試驗頭部與尾巴拖曳長度比值之比較	44
表八、孕婦菸害暴露情形與新生兒 DNA 損傷積分之迴歸分析	45
表九、孕婦菸害暴露狀態與出生結果之迴歸分析(以新生兒 DNA 損傷積分做分層)	46
圖一、新生兒 DNA 損傷積分與出生體重之相關	47
圖二、新生兒 DNA 損傷積分與出生身長之相關	48
圖三、新生兒 DNA 損傷積分與出生頭圍之相關	49
圖四、新生兒 DNA 損傷積分與出生胸圍之相關	50

## 中文摘要

**背景:**許多研究指出婦女在懷孕期間吸菸或暴露於二手菸會對胎兒產生許多不利的影響，這是目前公共衛生的重要議題之一。本研究探討懷孕婦女之菸害暴露與其新生兒代謝基因多型性、DNA 損傷及出生結果之關係。

**材料與方法:**資料來源為國民健康局九十二年度菸害防治研究及工作計畫「吸菸或二手菸影響孕期、生產期女性之健康研究」。該研究為 2003 年 8 月 1 日至 2004 年 10 月 30 日間所進行之前瞻性研究。除收集懷孕婦女各孕期之血液(包含 DNA)、尿液等檢體外，並以問卷方式取得孕婦之菸暴露及其他相關資料(包含懷孕史、疾病史等)，且在分娩時量取 383 位新生兒出生結果並取得臍帶血檢體。使用 PCR-RFLP 檢測新生兒五種代謝基因多型性(CYP2A6、CYP1A1、GSTT1、GSTM1 及 NAT2)，利用彗星試驗評估新生兒 DNA 損傷程度。

**結果:**將新生兒依母親菸害暴露的情形分為三組，其中 175 人(45.7%)為非吸菸組、184 人(48.0%)為二手菸暴露組、24 人(6.3%)為吸菸組。分析結果顯示暴露二手菸的新生兒出生結果較差，但不顯著；調整 CYP2A6 基因多型性及其他可能的干擾因子後，二手菸暴露組之新生兒平均出生頭圍比非吸菸組小 0.71 公分。另外，新生兒 DNA 受損程度，以二手菸暴露組之新生兒最為嚴重( $69.73 \pm 42.26$ )，且隨著新生兒 DNA 損傷程度的增加，出生體重、身長、頭圍及胸圍都有下降的趨勢。特別是 DNA 為高度損傷(DNA 損傷積分 $>50$ )時，母親暴露於二手菸者，其新生兒與非吸菸組比較，出生體重輕 262.19 公克、身長小 1.25 公分以及頭圍小 0.94 公分，且皆具統計上的顯著性( $p < 0.05$ )。

**結論:**孕婦在懷孕期間暴露於二手菸可能與新生兒的成長(出生體重、身長、頭圍與胸圍)以及 DNA 損傷的程度有關。但本研究未觀察到新生兒 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 及 NAT2 四種代謝基因多型性與出生結果或 DNA 損傷的關聯性。

**關鍵字:**孕婦、二手菸、彗星試驗、DNA 損傷、出生結果

## Abstract

**Background:** Previous studies have shown that cigarette smoking contributes to various harmful effects for pregnancy maternity and neonates, and it remains a major public health problem. In this study, we examined the relationship among maternal environmental tobacco smoking, newborn DNA damage and the associated birth outcomes.

**Methods:** This study comprised 383 paired samples of pregnancy maternity and newborns. For the three trimesters, blood and urine specimens were collected and structured questionnaire were administrated. Further, neonatal serum samples and their birth outcomes (including height, weight, head circumference etc.) were collected as well with consent. Genotype analyses of CYP2A6, CYP1A1, GSTT1, GSTM1, and NAT2 were performed by PCR-RFLP. Finally, we utilized the comet assay to measure the degree of newborn DNA damage.

**Results:** Among the 383 participants, 175(45.7%) were non-smokers, 184(48.0%) exposed to ETS and 24(6.3%) were smokers. The ETS-exposed women were adversely associated with neonates in various birth outcomes, but not significant. Infants who were born to ETS-exposed women had smaller head circumference than those to women who were non-smokers. The degree of newborn DNA damage was not related to metabolic polymorphic genes. Analytical findings indicated that the levels of newborn DNA damage in smoking and ETS-exposed groups were higher than that in non-smoking group. The difference was particularly significant for the ETS vs. non-smoking groups ( $69.7 \pm 42.3$  vs.  $54.0 \pm 33.8$ ,  $p=0.004$ ). The increase in DNA damage levels was positively associated with an increased in infant adverse birth outcome. ETS-exposed women, in particular for those with serious DNA damage, had significantly lowered birth in weight ( $-262.2\text{g}$ ,  $p=0.002$ ),

height (-1.3cm,  $p=0.006$ ), and head circumference (-0.9cm,  $p=0.007$ ).

**Conclusion:** Our results suggest that infant birth outcomes are adversely correlated with maternal ETS-exposure. In addition, newborn DNA damage is significantly associated with maternal ETS-exposure. On the other hand, relationships among newborn metabolic polymorphic genes, newborn DNA damage and birth outcomes are not explicitly observed.

**Keywords:** Pregnant women 、 ETS 、 comet assay 、 newborn DNA damage 、 birth outcome



## 第一章、前言

世界衛生組織(2003)指出，全球六十億人口中，約有十二億人吸菸；其中男性吸菸率(48%)是女性(12%)的四倍<sup>(1)</sup>。根據2002年的「台灣地區國民健康促進知識、態度與行為調查」，台灣目前18歲以上成人吸菸率為28.2%，男性的吸菸比率達50.0%，女性則為5.8%<sup>(2)</sup>。溫等人的研究指出，台北地區公教人員中懷孕婦女的吸菸率為2.2%<sup>(3)</sup>。根據國民健康局九十二年度菸害防治研究計畫「吸菸或二手菸影響孕期、生產期女性之健康研究」所收取的樣本，孕婦吸菸比率為7.7%，而二手菸暴露的比例則高達58%<sup>(4)</sup>。近年來的調查指出，女性吸菸率有上升趨勢，且有年輕化的傾向<sup>(5)</sup>，這意味著未來可能有更多的孕婦吸菸或吸入二手菸，這是一個值得注意的公共衛生課題。

目前許多研究證實，懷孕婦女吸菸除了增加子宮外孕、前置胎盤(Placenta previa)、子宮內生長遲滯(IUGR, intrauterine growth retardation)的機率<sup>(6)</sup>，也容易出現早產、低出生體重的情形，以及平均體重較輕、身長較短、頭圍較小的結果<sup>(7,8)</sup>。在懷孕期間暴露於二手菸的婦女，亦會增加胎兒死亡或早產的機率，或其胎兒的生長可能較為緩慢<sup>(9)</sup>。尼古丁(nicotine)是香菸中的重要成分，主要由肺吸收，並在血液中氧化成可丁寧(cotinine)。尼古丁及其代謝物可丁寧都會經由胎盤進入胎兒血液<sup>(10)</sup>，可丁寧濃度的下降與新生兒出生體重的增加一般呈現正相關<sup>(11)</sup>。但並非所有吸菸或暴露二手菸的孕婦都會產下體重較低的新生兒，這原因雖然還不明確，可能與母親或新生兒基因的易感受性有關<sup>(12)</sup>。先前已經有研究證實CYP2A6基因多型性與個體間不同的尼古丁代謝能力有關<sup>(13)</sup>。因此代謝基因「CYP2A6基因多型性」在孕婦的菸害暴露與其新生兒出生結果的關係中，可能是一個干擾因子(confounder)或修飾因子(effect modifier)。

另外，香菸的成分中包含了許多突變誘原(mutagens)與致癌物質(carcinogens)，主要的物質包括：多環芳香烴化合物(PAHs)、芳香胺(aromatic amines)



和N-亞硝胺 (N-nitrosamines) 等<sup>(12, 14)</sup>。這些物質經由兩階段的酵素代謝，第一期以 cytochrome P450 為主，可使致癌物質活化成有毒性或致癌性的中間產物，會與核苷酸形成共價鍵結，造成DNA的損傷；第二期的代謝酵素包括麩胺基硫轉移酵素 (glutathione S-transferase, GST)、N-乙醯基轉移酵素 (N-acetyl transferase, NAT) 等，可使被活化的中間產物形成親水性物質而排出體外，具有解毒作用。當第一期代謝酵素活性增加，同時缺乏第二期解毒酵素活性時，可能會使菸暴露孕婦的新生兒出生結果受到影響<sup>(15)</sup>。

已知進入體內的PAHs經過代謝後，其代謝物會與DNA鍵結、形成DNA鍵結物，這些DNA鍵結物會導致鹼基配對錯誤，若無法修補則會造成DNA突變或斷裂。近年來有不少細胞遺傳學研究證明，吸菸者染色體變異及姐妹染色體互換 (sister chromatic exchange, SCE) 的機率增加<sup>(16, 17)</sup>；並且在彗星試驗中，吸菸者細胞的DNA損傷較非吸菸者嚴重<sup>(18)</sup>。

有鑒於先前探討吸菸或暴露二手菸的孕婦與其新生兒出生結果之關係的研究中，多數的研究是討論孕婦吸菸與本身基因多型性之交互作用對出生結果的影響，以及孕婦吸菸或暴露二手菸對其自身染色體變異及姐妹染色體互換頻率的影響。對於新生兒基因多型性的關聯程度及DNA損傷評估的研究相當有限。本研究基於以下兩個假說(hypothesis)：第一，孕婦吸菸或暴露二手菸對新生兒出生結果會有所影響；第二，孕婦吸菸或暴露二手菸會增加新生兒DNA的損傷程度。據此，本研究有以下三個目的：

1. 探討新生兒CYP2A6基因多型性與臍帶血可丁寧濃度間的關係；
2. 探討孕婦及新生兒之CYP2A6基因多型性在上述關係中之干擾或修飾作用；
3. 探討孕婦菸暴露與新生兒DNA損傷程度及出生結果間之關聯性。

## 第二章、文獻探討

### 第一節、婦女吸菸之盛行率

世界衛生組織 2003 年的資料顯示全球女性吸菸率為 12%<sup>(1)</sup>。而美國小兒科學會 (American Academy of Pediatrics) 於 2003 年的調查結果<sup>(19)</sup>發現，美洲印地安人及非西班牙裔白人的懷孕婦女吸菸率最高分別為 18.1%及 14.3%，非西班牙裔黑人 (8.3%)與波多黎各(7.9%)孕婦的吸菸率居中，而亞洲與太平洋群島、墨西哥、古巴以及中南美洲的孕婦吸菸率最低(1~3%)。另外，婦女在懷孕期間暴露二手菸的情形，Nakamura 等人<sup>(20)</sup>的研究顯示，聖保羅的懷孕婦女吸菸率為 55.7%，其中主動吸菸者與被動吸菸者分別佔 5.5%及 35.9%。

台灣近年來女性吸菸率有上升趨勢，且有年輕化的現象。行政院衛生署 2005 年所公佈的資料，女性吸菸率為 5.95%<sup>(21)</sup>。而台灣未曾吸菸的女性在家中的二手菸暴露率為 58.1%，且約有 40%的婦女每天都有二手菸暴露的情形<sup>(22)</sup>。在生育年齡(18~44 歲)範圍內，約有 57~59%未曾吸菸的婦女會有暴露二手菸，比同年齡男性的暴露率 (36~52%)高出許多<sup>(22)</sup>。

### 第二節、母親吸菸或暴露二手菸與新生兒出生結果的關聯性

女性吸菸者除了在子宮頸癌、肝癌、肺癌、心血管疾病和呼吸道疾病方面有較高的死亡率外<sup>(23)</sup>，懷孕期間暴露於菸害環境中也會對胎兒及新生兒的成長發育造成影響，甚至與孩童疾病的發生也有關聯性。例如，婦女在懷孕期間吸菸，其孩童二歲前罹患氣喘的危險性是母親從未吸菸之孩童的2.2倍<sup>(24)</sup>，在孩童七歲前則是1.3倍<sup>(25)</sup>。文獻指出，在懷孕期間吸菸的孕婦早產(OR=1.18~1.69)以及產下低出生體重的胎兒 (OR=1.60~2.15)的危險性較高<sup>(7)</sup>、新生兒的出生頭圍可能較小<sup>(7)</sup>或體重較低<sup>(26)</sup>、容易死產或出生28天內新生兒死亡(OR=1.14~1.61)<sup>(7, 8, 25)</sup>。就二手菸暴露而言，母親在懷孕期間暴露於二手菸者，其早產的危險性增加較高(OR=1.30~6.12)<sup>(27)</sup>、產下低出生

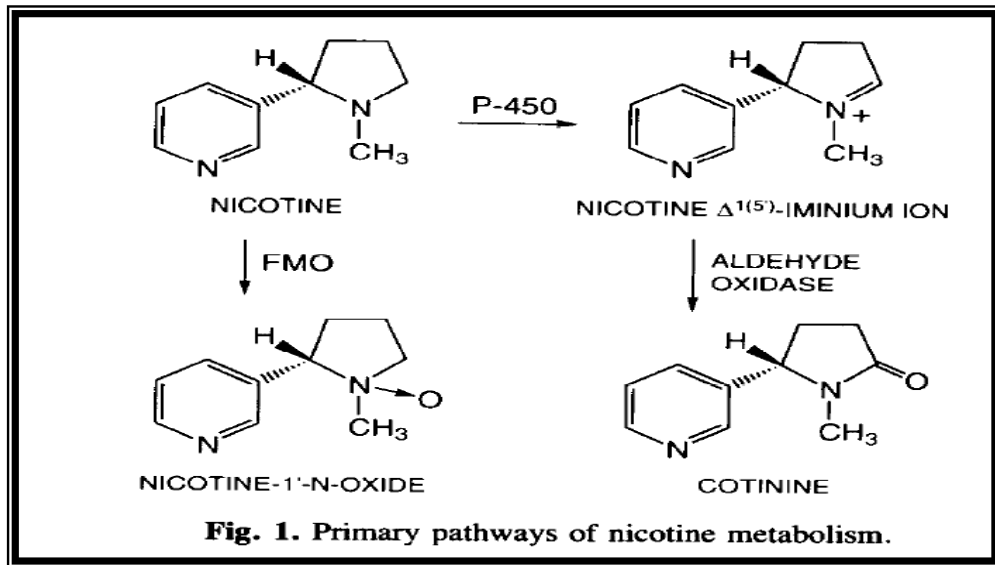
體重新生兒的機率亦較高<sup>(28)</sup>、胎兒的發育較為遲緩<sup>(9)</sup>等。台灣在婦女吸菸及二手菸暴露和低出生體重嬰兒的研究方面則未發現母親吸菸會顯著增加嬰兒低出生體重的危險性，但發現隨二手菸暴露量增加，產出低出生體重嬰兒危險性也隨之增加<sup>(29)</sup>。

### 第三節、可丁寧濃度與新生兒出生結果的相關

香菸中的尼古丁吸入肺部之後，能迅速通過肺泡黏膜而進入血液中，大部份在肝臟內迅速地被代謝成可丁寧(cotinine)，可丁寧半衰期(約 15~20 小時)較尼古丁長，所以測量血液或尿液中可丁寧(cotinine)濃度可作為菸害暴露的指標<sup>(30)</sup>。在 1987 年前多數的研究是在驗證菸害的暴露與可丁寧濃度的關係，並沒有研究者探討用孕婦的可丁寧濃度來預估對新生兒出生結果的不利影響方式是否比單單考慮孕婦吸菸量來得好，直到 1987 年 Haddow 等人<sup>(31)</sup>的研究證明吸菸與出生體重的關係，以及可丁寧濃度可以用來評估及監控婦女懷孕期間的菸害暴露量。在這之後，陸續有研究探討孕婦吸菸、可丁寧濃度與新生兒出生結果的關係。1995 年 Eskenazi 等人<sup>(32)</sup>提出新生兒出生體重隨著母親第二孕期可丁寧濃度的增加而下降。2001 年的一個研究中雖然也提出母親吸菸量越少或尿液可丁寧濃度越低其新生兒體重越重，可是為非線性的關係，而且尿液可丁寧濃度對出生體重的解釋力並沒有高於每天吸菸數量的解釋力<sup>(33)</sup>。

### 第四節、CYP2A6 基因多型性與可丁寧濃度

從前一節的文獻探討中可以看出不是所有吸菸的母親可丁寧濃度都會升高，也並非所有可丁寧濃度高的母親都會產下體重較低的新生兒，這可能與代謝基因 CYP2A6 的基因多型性有關。尼古丁約有 70%~80% 會代謝成可丁寧，其代謝機轉是兩階段的化學反應：第一個階段，尼古丁經過 cytochrome 450 (CYP) 2A6 基因的催化作用後，會轉化成 nicotine-1(5')-iminiumion；第二階段 nicotine-1(5')-iminiumion 持續受到細胞質中乙醛氧化酶(aldehyde oxidase)的催化作用，進而轉化成可丁寧(如下圖所示)<sup>(34, 35)</sup>，可是人類在尼古丁代謝能力上具有很大的個體間差異<sup>(36)</sup>。



CYP2A6 基因位於染色體 19q13.2 上，對偶基因分別為：(1)CYP2A6\*1A 為野生型(wild-type)，(2) CYP2A6\*1B 為 CYP2A6 基因與 CYP2A7 基因的 3'端未轉譯區產生互換(conversion) 所發生的部份變異，(3) CYP2A6\*4C 為 CYP2A6 基因的缺失型(whole deletion)。其中 CYP2A6\*1A 與 CYP2A6\*1B 具有完整的活性，CYP2A6\*4C 則不具活性<sup>(13)</sup>。對偶基因頻率在不同的種族上具有差異，日本人 CYP2A6\*1A 與 CYP2A6\*1B 的頻率分別為 42.4%與 37.5%；中國人(China)的頻率各為 43.2%與 40.6%；西班牙人為 66.5%和 30.0%<sup>(37)</sup>。另外，CYP2A6\*4C 在中國人佔 15.1%，西班牙人佔 0.5%，在日本人的頻率最高為 20.1%<sup>(38)</sup>。Nakajima 等人<sup>(13)</sup>的研究證明個體間尼古丁的代謝能力與 CYP2A6 基因多型性具有相關性，因為 CYP2A6\*4C 異型合子的代謝能力較低，所以 CYP2A6\*4C/ 4C 的個體缺乏可丁寧形成。另外，CYP2A6\*1A/CYP2A6\*1B 尼古丁的代謝能力優於 CYP2A6\*1A/CYP2A6\*1A<sup>(13)</sup>。換句話說，不同種族具有不同的 CYP2A6 對偶基因頻率，使得尼古丁的代謝能力在不同的種族會有所差異。

## 第五節、代謝基因多型性及新生兒出生結果

香菸的煙分為主流煙(mainstream)和側流煙(sidestream)二種。「主流煙」就是抽

菸人吸入肺部的煙，而「側流煙」則是從點燃的香菸中冒出來的煙，也就是所謂的二手菸(environmental tobacco smoke, ETS)。香菸燃燒後含有四千多種化學物質，其中有 52 種化學物質在國際癌症研究機構(International Agency for Research on Cancer；簡稱：IARC)的分類中是屬於是致癌物質或可能具致癌性物質<sup>(39)</sup>，最主要的物質為多環芳香烴化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons；PAHs)、芳香胺(aromatic amines)和 N-亞硝胺(N-nitrosamines)<sup>(12, 14)</sup>，這些物質將經由兩階段的酵素所代謝。例如，多環芳香烴化合物及芳香胺吸入人體後由第一期代謝酵素 CYP1A1 活化成有毒性或致癌性的中間產物，若這些產物留在體內則容易攻擊 DNA，而形成 DNA 鍵結物或造成 DNA 損傷。第二期的代謝酵素包括麩胺基硫轉移酵素(glutathione S-transferase, GST)、N-乙醯基轉移酵素(N-acetyl transferase, NAT)，麩胺基硫轉移酵素中的 GSTT1 及 GSTM1 則負責水解 PAHs 的中間產物，N-乙醯基轉移酵素家族中的 NAT2 則負責代謝芳香胺的中間產物，將被活化的中間產物形成親水性物質，使人體容易將其排出體外，具有解毒作用。當第一期代謝酵素活性受到抑制且第二期解毒酵素活性增加時，細胞受到有毒物質的影響應該是最小。在 2002 年的一個病例對照研究結果顯示，懷孕婦女吸菸且 CYP1A1 基因是野生/變異或變異/變異(活性增加)、GSTT1 基因是無效型(活性受抑制)與未曾吸菸的母親且 CYP1A1 基因是野生/野生、GSTT1 基因是非無效型的新生兒比較，其平均出生體重輕 1285 公克及懷孕週數短 5.2 週<sup>(12)</sup>。韓國 2003 年的研究中也提到暴露於二手菸的懷孕婦女 GSTT1 或 GSTM1 基因是無效型時其新生兒的出生體重較輕；但比二手菸暴露的母親其 GSTT1 和 GSTM1 基因同時為無效型的新生兒出生體重較重<sup>(40)</sup>。Nukui 等人<sup>(41)</sup>的研究亦指出孕婦在第三孕期吸菸，孕婦和其新生兒任一人或同時為 GSTT1 為無效型時，會增加早產的危險性。現有的文獻印證了在母親暴露於菸害環境與新生兒出生結果的關係中，兩階段的代謝基因為一個中介的修飾因子或干擾因子。

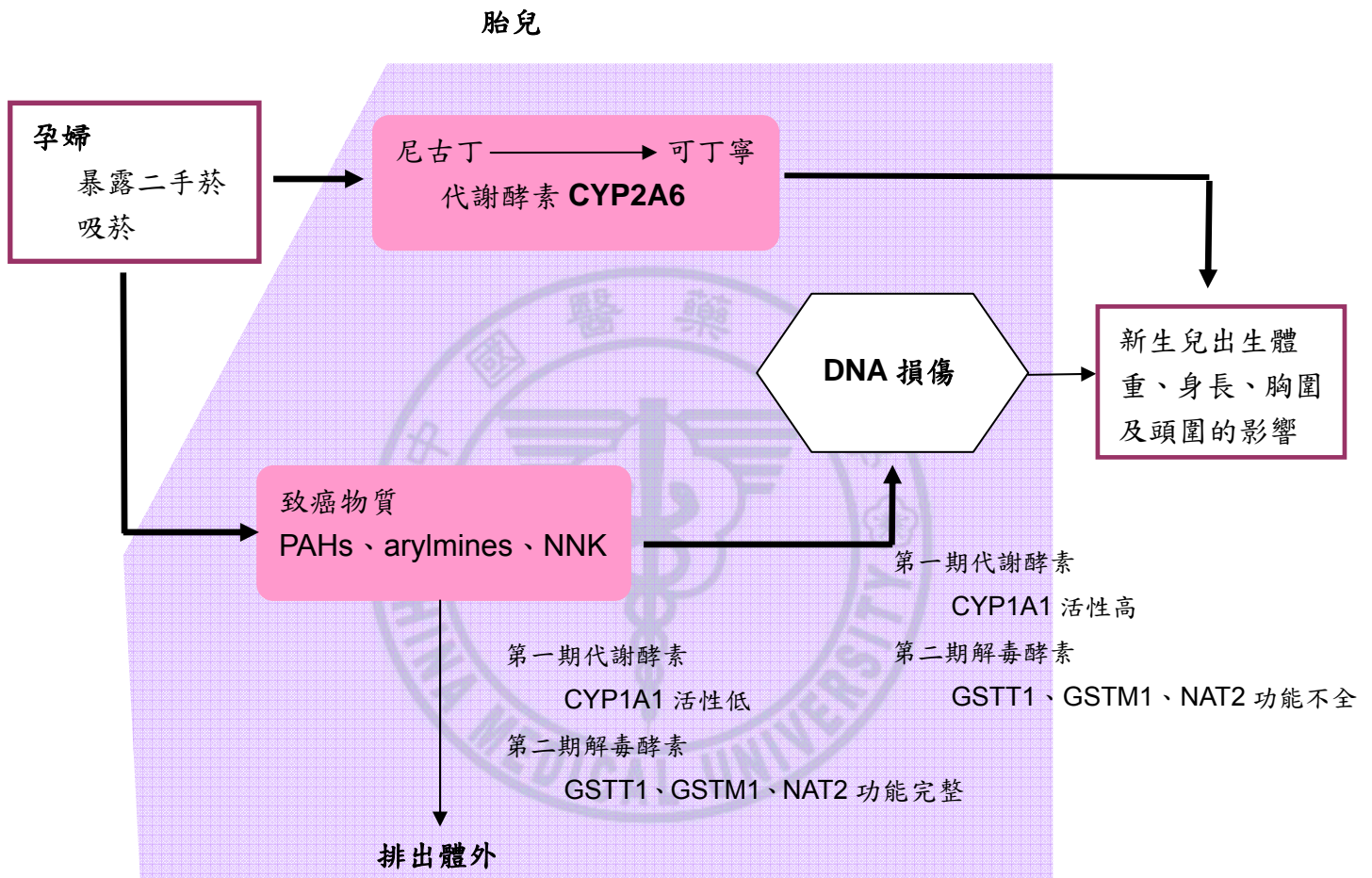
## 第六節、孕婦菸害暴露情形與新生兒 DNA 損傷的相關

懷孕婦女吸菸或吸入二手菸，其有害物質或代謝後的中間產物可能會經由胎盤進入胎兒血液內。許多文獻證實成年的吸菸者其染色體變異的頻率及姐妹染色體互換的頻率較高<sup>(42)</sup>。但香菸中的有害物質對胎兒及新生兒 DNA 影響之研究則相當有限；大部分都是使用間接的資料來評估對胎兒的影響。例如，吸菸者的胎兒平均每個絨毛膜絨毛細胞中有 8.9 個姐妹染色體互換顯著高於非吸菸者的胎兒(5.8 個)<sup>(43)</sup>。另外亦有研究指出吸菸與非吸菸之母親的新生兒絨毛膜絨毛細胞的染色體變異頻率並無差異<sup>(44)</sup>。de la Chica 等人<sup>(15)</sup>利用羊膜細胞的染色體不穩定性(Chromosomal Instability)當指標，探討母親吸菸對胎兒 DNA 的影響，結果發現隨著母親吸菸量的增加胎兒的染色體不穩定性也增加。對新生兒而言，母親懷孕期間吸菸的新生兒臍帶血染色體轉位的頻率也明顯地較高<sup>(45)</sup>。



### 第三章、材料與方法

#### 第一節、研究架構



#### 第二節、研究對象

本研究資料來源為國民健康局九十二年度菸害防治研究及工作計畫「吸菸或二手菸影響孕期、生產期女性之健康研究」<sup>(4)</sup>，為 2003 年 8 月 1 日至 2004 年 10 月 30 日間所進行之前瞻性研究。研究對象為參加產前檢查的懷孕婦女，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）。此研究以問卷訪視方式收集懷孕婦女各孕期之資料(第一孕期為未滿十七週，第二孕期為十七到二十九週，第三孕期資料收集的時點即指生產時)，包括懷孕史、疾病史、吸菸暴露之主觀評估等，同時取得孕婦血液及尿液檢體，進行尿液、血液可丁寧(cotinine)濃度分析與基因型別鑑定；且在孕婦分娩時以取得新生兒出生資料(包括性別、出生體重、身長、頭圍、胸圍等)，同時亦收集孕婦尿液、血液與新生兒臍帶血檢體，分析測量孕婦血液、尿液可丁寧濃度與新生兒血液可丁寧濃度、基因型別鑑定、DNA 損害程度；完整追蹤孕婦及其新生兒共有 383 對。

### 第三節、基因型檢定

利用萃取好的 DNA，以聚合酶鏈鎖反應及限制片段長度多型性(PCR-RFLP；polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism)之方法，進行新生兒 CYP2A6 及 NAT2 二種基因型之分析。兩種基因型所用之核酸引子序列如下表所示。

表 3-1、CYP2A6、NAT2 基因型之核酸引子(primer)序列

基因型	核酸引子序列
CYP2A6	5'-CACCGAAGTGTTCCCTATGCTG-3'
	5'-CTAAGCCTCAGTTTTGTACGTTG-3'
NAT2	5'-TCTAGCATGAATCACTCTGC-3'
	5'-GGAACAAATTGGACTTGG-3'

#### (1) CYP2A6 基因多型性之分析

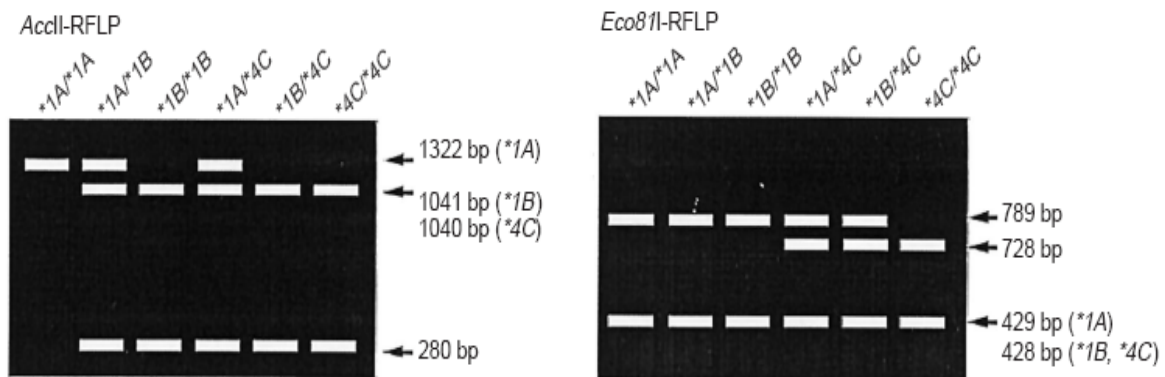
PCR 溶液總體積為 25 $\mu$ l，包括 2.5mM 去氧核苷三磷酸(dNTP)2.5 $\mu$ l、10X 聚合酶緩衝溶液 2.5 $\mu$ l、10uM 核酸引子【表 3-1】各 1 $\mu$ l、2U/ $\mu$ l 聚合酶 0.5 $\mu$ l、15mM 氯



化鎂 0.8 $\mu$ l 及濃度約 150 ng/ $\mu$ l 的 DNA，接著加入滅菌水(ddH<sub>2</sub>O)使總體積達 25 $\mu$ l。實驗反應條件一開始為熱開始(Hot start)，94 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘使雙股 DNA 變性，其次是 94 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘，68 $^{\circ}$ C 反應 30 秒，72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘三步驟進行 5 個循環，接著再以 94 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘，64 $^{\circ}$ C 反應 30 秒，72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘三步驟進行 35 個循環，最後設定在 72 $^{\circ}$ C 反應 6 分鐘。

將 PCR 產物與 DNA loading dye 在石蠟紙上混合均勻後，以洋菜膠電泳法進行分析。分析之條件是採用 1%瓊脂膠(Agarose)於 0.5 $\times$  TBE 中以固定電壓 110 伏特跑 30 分鐘後，以溴化乙錠 (ethidium bromide，簡稱 EtBr) 染色，在紫外燈 (UV) 下觀察，PCR 產物位於 1322base pair (bp)的位置。

接著在 PCR 產物內分別加入 *AccII* 與 *Eco81I* 限制酶、限制酶反應溶液及滅菌水至總體積 20 $\mu$ l，放置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽內 3 小時，使其反應完全，再以 2%的瓊脂膠進行電泳分析，在紫外燈下觀察與照相，其產生片段如下圖所示<sup>(46)</sup>。



CYP2A6 基因經由限制酶切割出三種對偶基因(1A、1B、4C)，野生型(wild-type)為 CYP2A6\*1A，野生型同型合子只被 *Eco81I* 限制酶作用產生 789、429bp 的片斷；而 CYP2A6\*1B 為 CYP2A6 基因與 CYP2A7 基因的 3'端未轉譯區產生互換 (conversion) 所發生的部份變異，同時會被 *AccII* 與 *Eco81I* 限制酶作用，分別產生 1041、280bp 及 789、429bp 的片斷；另外，CYP2A6 基因缺失型(whole deletion)為 CYP2A6\*4C，也同時會被 *AccII* 與 *Eco81I* 限制酶作用而產生 1040、280bp 與 728、428bp 的片斷。

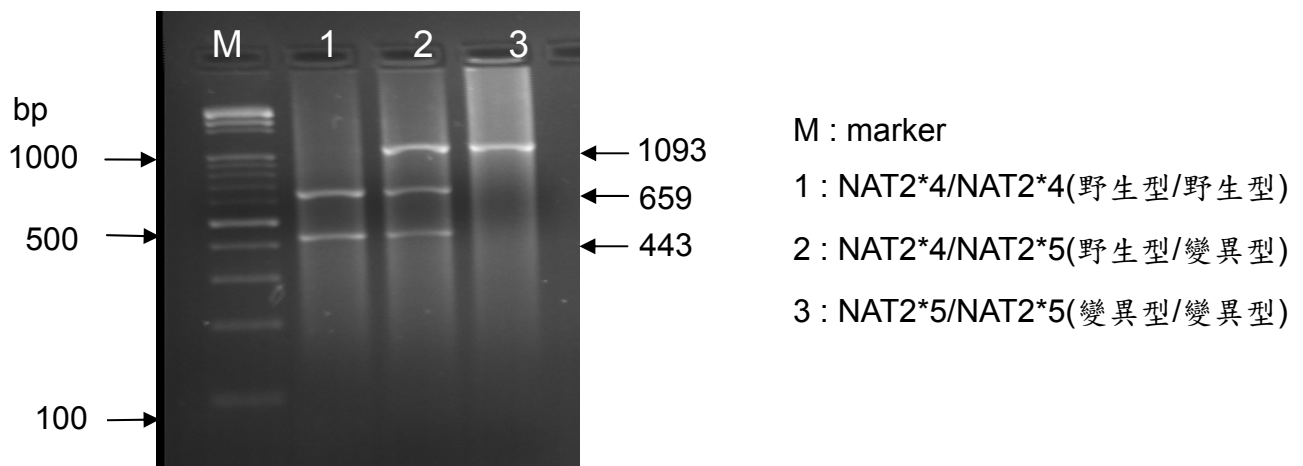
## (2) NAT2 基因多型性之分析

NAT2 基因多型性之分析是利用 PCR-RFLP 之方法，取約 150 ng/ $\mu$ l 的 DNA 為模板進行 PCR 反應，PCR 溶液為濃度約 150 ng/ $\mu$ l 之 DNA、2.5mM 去氧核甘三磷酸(dNTP) 5 $\mu$ l、10X 聚合酶緩衝溶液 5 $\mu$ l、10uM 核酸引子【表 3-1】各 1.8 $\mu$ l、2U/ $\mu$ l 聚合酶 1 $\mu$ l、25mM 氯化鎂 1 $\mu$ l，接著加入滅菌水(ddH<sub>2</sub>O)使總體積達 50 $\mu$ l。PCR 反應一開始為熱開始(Hot start)，95 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘使雙股 DNA 變性，其次是 94 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘，54 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘，此循環重複 40 次，最後設定在 72 $^{\circ}$ C 反應 6 分鐘；PCR 反應產物為 1093bp 的片斷，以 1%的瓊脂膠(Agarose)於 TBE 緩衝溶液中進行電泳分析。

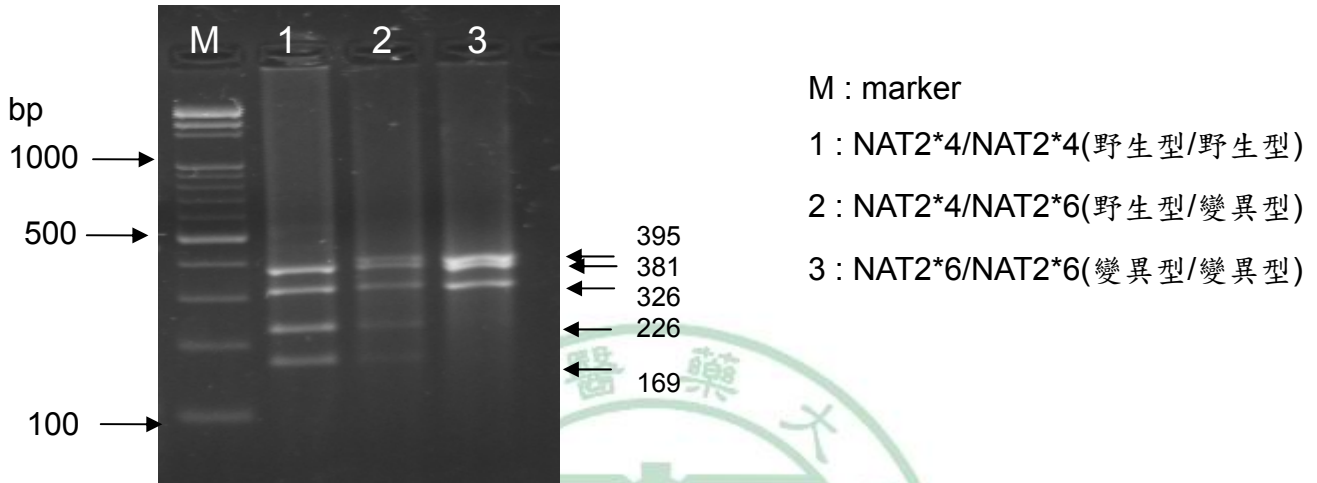
將所得之 PCR 產物分別加入 Kpn I、Taq I 與 BamH I 限制酵素及限制酵素反應溶液，補滅菌水至總體積 20 $\mu$ l，放置於 37 $^{\circ}$ C (Kpn I、BamH I)或 65 $^{\circ}$ C (Taq I)水浴槽 3 小時，使其反應完全，再以 3%的瓊脂膠進行電泳分析，在紫外燈下觀察與照相，其結果判讀方式如下。

NAT2 野生型(wild-type)為 NAT2\*4，野生型同型合子之兩條對偶基因都可被 Kpn I、Taq I 與 BamH I 限制酵素作用。

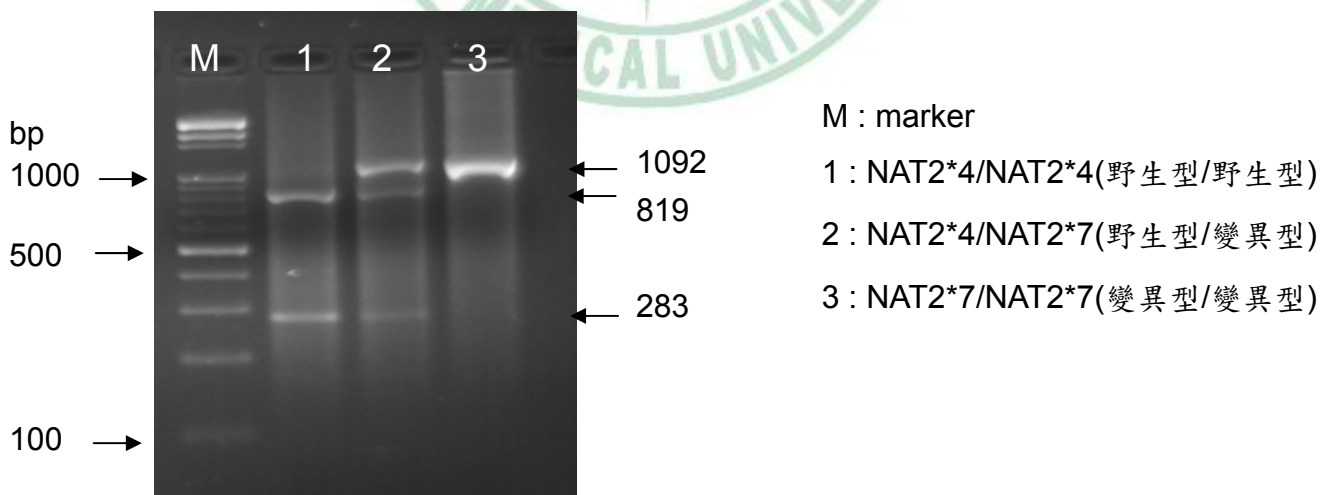
NAT2\*5 (M1 Allele)為 Kpn I 型，於 C481T 產生取代，此變異型(variant)的同型合子均無 Kpn I 限制酵素切點，只有一條 1093bp 的 DNA 片斷；若為野生型同型合子則有一個 Kpn I 限制酵素切點，而產生 659bp 及 443bp 的 DNA 片斷；因此，若為變異型異型合子則應同時出現 1093bp、659bp 及 443bp 的 DNA 片斷。



Taq I 型為 NAT2\*6 (M2 allele)，在 G590A 產生取代，野生型同型合子會出現 381bp、326bp、226bp 及 169bp 的 DNA 片斷；變異型同型合子則有兩個 Taq I 酵素之切點，產生 395bp、381bp 及 326bp 的 DNA 片斷；因此變異型的異型合子會出現 395bp、381bp、326bp、226bp 及 169bp 五個 DNA 片斷。



BamH I 型為 NAT2\*7 (M3 allele)，在 G857A 產生取代，變異型的同型合子均無 BamH I 限制酵素的切點，因此只產生 1092bp 的 DNA 片斷；野生型的同型合子具有一個 BamH I 限制酵素的切點，而產生 819bp、283bp 的 DNA 片斷；因此變異型的異型合子會同時出現 1092bp、819bp 及 283bp 三個 DNA 片斷。



NAT2 基因之表現分型，若兩條對偶基因均為野生型或是只有一條對偶基因為變異型則歸類為 NAT2 快型，若兩條對偶基因有兩個以上的變異型則歸類為 NAT2 慢型。

### (3)CYP1A1、GSTT1、GSTM1 基因多型性之分析

新生兒 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 三個代謝基因多型性之資料由本實驗室先前已完成之國健局計畫所提供。

## 第四節、彗星試驗

彗星試驗(comet assay)又稱單細胞凝膠電泳法(single cell gel assay)【註一】，用來偵測 DNA 損傷的程度。其之所以被稱為彗星試驗，是因為 DNA 受到損傷而產生斷裂，經由電泳的方式，斷裂之 DNA 片段會以類似彗星的型態出現(包含頭部及尾部)，且當 DNA 損傷越嚴重其尾巴拖曳就越長。以 Nikon 螢光顯微鏡 400X 物鏡隨機觀察約 100 個細胞 DNA 的損傷程度，其判定方式有二種：

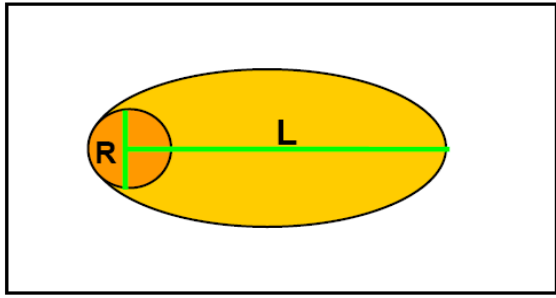
#### (1)目視觀測方法：

以彗星尾巴拖曳長度(L)與頭部直徑(R)之比值(圖(a))，將 DNA 損害程度分為五個等級。

- a. 無受損程度(no damage)，具有完整的細胞外觀(圖(b))。
- b. 低程度傷害(low level damage)：彗星尾巴拖曳長度等於頭部直徑(圖(c))。
- c. 中度傷害(medium level damage)：彗星尾巴拖曳長度約為頭部直徑的 2 倍(圖(d))。
- d. 高度傷害(high level damage)：彗星尾巴拖曳長度大於 2 倍頭部直徑，但小於三倍(圖(e))。
- e. 完全傷害(total damage)：彗星尾巴長度等於頭部直徑的 3 倍以上，且幾乎看不到彗星頭部(圖(f))。

計算 DNA 損傷積分(damage score)<sup>(47)</sup>，其方式如下

DNA 損傷積分 = [(總個體中無受損之細胞數×0+低程度傷害之細胞數×1+中度傷害之細胞數×2+高度傷害之細胞數×3+完全傷害之細胞數×4)/總細胞數]×100



(a) 彗星尾巴拖曳長度(L)與頭部直徑(R) (b)無受損程度

示意圖



(c) 低程度傷害

(d) 中度傷害



(e) 高度傷害

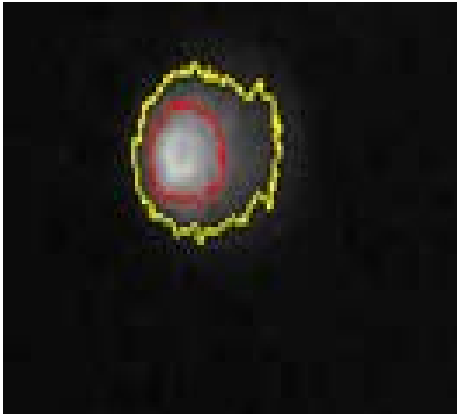
(f) 完全傷害

### 圖、DNA 損傷分級

彗星試驗以目視方法在判斷 DNA 損傷等級時，會依研究者的不同而有所差異，因此，在這研究中使用系統抽樣(systemic sampling)的方法，從 222 位新生兒中，選出 21 位的樣本，則抽樣間距(sampling interval)為 10，請另一位經過判斷 DNA 損傷等級訓練的同學在雙盲的情形下進行判別；兩位同學判別後所計算的 DNA 損傷積分 Pearson 相關係數為 0.72( $p=0.0002$ )。

## (2)影像分析方法:

使用影像分析軟體 Image-Pro Plus5.0 版測量彗星頭部直徑和尾巴拖曳長軸，亦將 DNA 損傷程度分為五個等級並計算 DNA 損傷積分；另外，也計算彗星頭部與尾巴拖曳長軸之比值。



$$\text{score} = (\text{尾巴-核的半徑}) / \text{核的直徑}$$

無受損程度:score 為 0~1

低程度傷害:score 為 1~2

中度傷害:score 為 2~3

高度傷害:score 為 3~4

完全傷害:score >4

【註一】彗星試驗由本實驗室先前之國健局計畫所操作完成，但新生兒細胞彗星試驗之目視觀測及影像分析則由筆者分析判定。

## 第五節、統計分析

孕婦與新生兒基本人口學資料在吸菸、二手菸暴露及未曾吸菸組之間的分布，以變異數分析(ANOVA)、等級和檢定(Wilcoxon rank-sum test)或卡方檢定比較之。使用卡方檢定分析代謝基因 CYP2A6、CYP1A1、GSTT1、GSTM1 和 NAT2 基因多型性在菸害暴露三組間分布之相關性，當細格中期望次數超過 20%以上個數小於 5 時，則使用費雪精確型檢定(Fisher's exact test)。另外，利用線性迴歸模型分析孕婦菸害暴露情形與新生兒出生結果之相關，以及孕婦菸害暴露情形、新生兒 DNA 損傷與出生結果的關係。所有上述之統計分析程序均使用 SAS 8.2 版軟體。

## 第六節、使用試劑及儀器

### (1)PCR-RFLP 使用試劑

1. Agarose(Bio-M Bioscience ; Promega, USA)
2. Ethidium Bromide (Amresco)
3. 2.5mM 去氧核苷三磷酸(dNTP) (Yeastern Biotech)
4. 10uM 核酸引子(Primer) (Mission Biotech)
5. 聚合酶(Taq) (Protech ; Yeastern Biotech)
6. 10X 聚合酶緩衝液(Protech ; Yeastern Biotech)
7. ACC II restriction enzyme(Takara, Japan)
8. Eco81 I restriction enzyme(Takara, Japan)
9. Kpn I restriction enzyme(Promega, USA)
10. Taq I restriction enzyme(BioLab, New England)
11. BamH I restriction enzyme(BioLab, New England)
12. RE 10X buffer(Takara, Japan ; Promega, USA ; New England)
13. BSA(bovine serum albumin) (Promega, USA ; BioLab, New England)
14. 100bp Ladder(Protech)
15. 1X TBE buffer (Amresco)

## (2)使用儀器

1. 4°C 雙門冰箱
2. -20°C 冰櫃
3. 恆溫水浴槽(FIRSTEK)
4. 聚合酶反應槽
5. 水平電泳槽(GENEPURE)
6. 柯達 DCS260 紫外燈照相系統
7. 柯達影像分析軟體
8. 影像分析軟體 Image-Pro Plus5.0 版





## 第四章、研究結果

本研究 383 對孕婦與新生兒具有完整問卷資料，其中並取得 306 名新生兒之臍帶血檢體。依懷孕婦女第一次問卷中「您曾經有吸菸的習慣嗎?」、「與您同住的人中，是否有人有吸菸的習慣?」以及「您工作場所內是否會聞到菸味?」等問題之回答，將其菸害暴露情形分為三組，分別為吸菸組(smoker)孕婦現在吸菸或曾經吸菸但目前已戒菸者，共 24 人；二手菸暴露組(ETS)伴侶吸菸或工作場所會聞到菸味的懷孕婦女，共 184 人；以及非吸菸組(non-smoker)，共 175 人<sup>(48)</sup>。

結果分為三小節分析(1)孕婦及新生兒的人口學變項依菸害暴露情形分組，並分析各變項之分布；(2)孕婦菸害暴露情形、可丁寧濃度與新生兒出生結果的關係，以及新生兒代謝基因--CYP2A6 基因多型性--與臍帶血可丁寧濃度的關係；(3)孕婦菸害暴露情形與新生兒 DNA 損傷的關係，以及新生兒本身 DNA 損傷程度對出生結果的影響。

### 第一節、基本人口學變項資料

孕婦的人口學資料如表一，全體平均年齡為 30.1 歲，懷孕前平均身體質量指數 (body mass index, BMI) 為 21.2kg/m<sup>2</sup>，平均懷孕週數為 39.2 週。六成以上的婦女為非家庭主婦(包括公、教師、農、工、商、自由、待業及其他)；教育程度以高中及專科者為最多(69.5%)，其次為大學以上(24.8%)，國中以下占 5.7%。三分之一的孕婦全家月收入為四萬到六萬，而六萬以上則約佔二分之一。五成以上的孕婦其胎兒為第一胎。在生活習慣方面，有喝酒習慣及喝咖啡頻率為常常或每天的孕婦分別為 3.4%、8.7%。若將孕婦以菸害暴露情形分組，發現孕婦吸菸組平均年齡最小為 28.6 歲，其次是二手菸暴露組為 29.5 歲，非吸菸組的平均年齡最大為 30.9 歲；而吸菸組平均懷孕週數為 38.7 週，二手菸組為 39.4 週，非吸菸組為 39.1 週，三組的平均年齡及懷孕週數皆具有統計上之顯著差異。另外，比較三組孕婦在不同職業、教育程度

及飲酒習慣中的分布，三組均具有統計上顯著之差異；在職業方面，非家庭主婦以二手菸組占最多為 73.2%，吸菸組與非吸菸組約略相同(56.5、57.0%)；就教育成度來看，吸菸組中八成的孕婦為高中及專科以下，二手菸組有 76.1%集中於高中及專科，而非吸菸組中以高中及專科和大學以上之學歷占最多各為 62.3%、34.9%；另外，吸菸組中曾經或目前有喝酒習慣的孕婦比例較高為 16.7%，二手菸組及非吸菸組中的孕婦高達九成都屬於無飲酒習慣。其餘人口學變項則不具統計上顯著差異。

吸菸的婦女平均懷孕年齡較低，推論可能是由於本身家庭環境、職業、教育程度或行為思想而造成。恰巧在這個研究中也發現婦女會因為職業的關係導致暴露於二手菸的比例增加。另外，而學歷越低者，暴露於二手菸及吸菸的婦女比例越高。

就新生兒的基本特性而言，依性別新生兒男生佔 55.35%。不分性別，全部新生兒平均出生體重、身長、頭圍及胸圍分別為 3188.6 公克、50.9 公分、33.5 公分及 32.8 公分。以母親菸害暴露情形分組，比較新生兒基本特質皆不具統計上的顯著差異，但這尚未調整任何其他變項。

## 第二節、探討孕婦菸害暴露情形、可丁寧濃度與新生兒出生結果的關係

### (一) 代謝基因 CYP2A6 基因多型性之分析

表二為母親及新生兒 CYP2A6 基因多型性與對偶基因之分布，排除 5 對基因型檢測失敗之母子配對。孕婦 CYP2A6\*1A、CYP2A6\*1B 及 CYP2A6\*4C 之對偶基因頻率分別為 0.36、0.17 和 0.47，若以基因型分佈來看，CYP2A6\*1A/1A、1A/1B、1B/1B、1A/4C、1B/4C 及 4C/4C 之基因型分布為 2.35%、4.71%、0.00%、62.75%、29.02%及 1.18%，三組中 CYP2A6 基因型的分佈是使用費雪精確型檢定(Fisher's exact test)，不過並無統計上的顯著差異。

新生兒對偶基因 CYP2A6\*1A、\*1B 及 \*4C 之頻率分別為 0.27、0.13 及 0.60。而 CYP2A6\*1A/1A、1A/1B、1B/1B、1A/4C、1B/4C 及 4C/4C 之基因型頻率各為 0.42%、

0.84%、1.27%、52.32%、21.94%及 23.21%。經由費雪精確型檢定，亦不具統計上之顯著差異。

由於母親及新生兒在各組中 CYP2A6\*1A/1A、1A/1B、1B/1B 基因型別的人數太少，因此將原來的六種基因型依其代謝力合併為以下三種型別：(1)至少帶有一個野生型(CYP2A6\*1A)對偶基因者:包括 1A/1A 與 1A/4C 兩種基因多型性；(2)至少帶有一個變異型 (CYP2A6\*1B)對偶基因者: CYP2A6\*1B/1B、1A/1B 及 1B/4C 皆歸類屬於此種基因型；(3)兩條對偶基因皆為整段缺失:CYP2A6 4C/4C 同型合子。其中將 1A/1B 基因型歸類於至少帶有一個變異型對偶基因者裡，是因為有文獻中指出 1A/1B 型代謝尼古丁能力較 1A/1A 基因型好<sup>(13)</sup>。CYP2A6 基因型重新分組後，母親的基因型分佈整段缺失(del/del)、至少帶有一個野生型對偶基因( $\geq$ wild type)和至少帶有一個變異型對偶基因( $\geq$ variant type)分別為 1.18%、65.10%和 33.73%；而新生兒基因型分佈各為 23.21%、52.74%和 24.05%。將孕婦及新生兒依菸害暴露情形分組後，新生兒各組間基因分佈具有顯著差異( $p=0.046$ )，孕婦則無顯著差異。

比較母親與新生兒之對偶基因頻率及基因分佈的情形是否相同，發現對偶基因頻率經由卡方檢定具有顯著差異( $p=0.0002$ )；而且不論使用哪一種基因型分組方式，基因型分布經由費雪精確檢定均具有統計上顯著意義。

## (二) 代謝基因 CYP2A6 基因多型性與可丁寧濃度之關係

新生兒臍帶血可丁寧濃度平均為 1.89ng/ml，若以 CYP2A6 基因型來分組，發現帶有\*1B 對偶基因者的可丁寧濃度最高為 1.90 ng/ml，其次是帶有\*1A 對偶基因、4C/4C 同型合子基因型者，分別為 1.60 及 1.40 ng/ml，但這樣的差異統計上不具顯著的意義。依照菸害暴露情形分層後，在非吸菸組及二手菸暴露組中以 4C/4C 基因型者為基準組，帶有\*1A 及\*1B 對偶基因的可丁寧濃度皆大於 4C/4C 基因型，且二手菸組裡帶有\*1B 對偶基因者之可丁寧濃度比基準組高 0.99 ng/ml，接近於顯著差異( $p=0.080$ )。吸菸組中並無帶有\*1B 對偶基因者的新生兒，因此無法比較吸菸組中各基因型組別的可丁寧濃度，只能看到帶有\*1A 對偶基因的可丁寧濃度比基準組低 4.89

ng/ml，接近於顯著差異。

為了探討新生兒 CYP2A6 不同基因型與臍帶血可丁寧濃度關係的估計值，除了使用簡單線性迴歸外，亦使用以下兩個複迴歸模型：(1)調整菸害暴露情形與(2)調整孕婦年齡、懷孕週數、職業、教育及菸害暴露情形。分析結果發現帶有\*1A 對偶基因、帶有\*1B 對偶基因與基準組(4C/4C)比較，其平均可丁寧濃度分別差 0.20 與 0.50 ng/ml，並無統計上顯著差異；調整菸害暴露情形與其他因子後，雖然差異幅度增加，但依然無統計上的顯著意義(如表三)。

### (三) 可丁寧濃度與出生結果之關係

孕婦不論尿液或血液可丁寧濃度皆隨著菸害暴露量增加而有上升的趨勢。血液平均可丁寧濃度比尿液可丁寧濃度稍低，但各孕期血液及尿液可丁寧濃度以 Spearman 等級相關係數檢定，其值皆大於 0.68，隨著孕期的變化相關係數越大。另外，孕婦生產期血液、尿液可丁寧濃度與新生兒臍帶血可丁寧濃度 Spearman 等級相關係數分別為 0.90 ( $p < 0.01$ )和 0.84 ( $p < 0.01$ )。

根據實驗室以前的分析結果<sup>(48)</sup>發現，第一孕期尿液、血液可丁寧濃度和新生兒出生體重與身長之間並無顯著的關聯性，而血液可丁寧濃度與頭圍的關聯性相當顯著。第二孕期尿液、血液可丁寧濃度和新生兒出生體重之間有顯著的關聯性，出生身長僅與尿液可丁寧濃度具有關聯性，第二孕期可丁寧濃度與頭圍的關聯性並不顯著。生產期之可丁寧濃度與三種出生結果的關聯性皆不顯著。

### (四) 母親菸害暴露的情形與新生兒出生結果之關係

以四個線性迴歸模型分析母親菸害暴露的情形與新生兒出生結果的關聯性，依變項為新生兒出生結果，自變項為母親菸害暴露情形，依照菸害暴露情形的三個組別來設立兩個虛擬變項(dummy variable)，以非吸菸組為基準組，迴歸係數( $\beta$ )為暴露組新生兒平均出生結果與基準組的差異。四個迴歸模型分別為：(1)模型一：簡單線性迴歸，探討母親菸害暴露的情形與新生兒出生結果的關係；(2)模型二：調整與新生兒出

生結果有關聯性的可丁寧濃度（出生體重:調整孕婦第二期血液及尿液可丁寧濃度，出生身長:調整孕婦第二期尿液可丁寧濃度，出生頭圍:調整孕婦第一期血液可丁寧濃度）；(3) 模型三:調整孕婦及其新生兒 CYP2A6 基因，(4) 模型四:調整孕婦人口學資料中具顯著差異之變項年齡、懷孕週數、職業、教育程度與飲酒習慣，以及在模型二與模型三中統計上具顯著意義( $p<0.05$ )之變項。

表四的結果顯示，簡單線性迴歸中二手菸暴露組比非吸菸組的新生兒平均出生體重較輕、身長較短且頭圍亦較窄，但皆無統計上的顯著差異。就出生體重及身長來說，經過不同的模型調整可能的因子後雖然差異有所改變，但依然無統計上的顯著差異。以出生頭圍而言，模型三中調整了孕婦及其新生兒 CYP2A6 基因後，二手菸暴露組的新生兒平均出生頭圍顯著的較非吸菸組小 0.66 公分。進一步，在模型四中放入所有可能的潛在因子後，二手菸暴露組與非吸菸組的新生兒平均出生頭圍差異更大，且依然具有統計上的顯著差異。另外，吸菸組與非吸菸組新生兒出生結果皆無顯著的差異。

### 第三節、新生兒基因型分佈頻率、DNA 損傷程度與出生結果之關係

#### (一) 新生兒 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 及 NAT2 基因型分佈

表五為四種代謝基因之基因型分佈，第一期代謝基因 CYP1A1\*野生/野生、野生/變異、變異/變異在全部新生兒中的頻率分別為 53.05%、36.62%及 10.33%。將 CYP1A1\*野生/變異與變異/變異合併後，CYP1A1\*野生/野生和 CYP1A1\*野生/變異、變異/變異在非吸菸組之新生兒分別為 46.81%及 53.19%，二手菸暴露組各為 58.65%及 41.35%，吸菸組各為 53.33%及 46.67%，經由卡方檢定三組中 CYP1A1 基因型的分布，並未達到統計上的顯著差異( $p=0.249$ )。

GSTT1 非無效型與無效型的比例分別為 54.46%、45.54%，GSTM1 非無效型與無效型的頻率各為 57.28%、42.72%；比較三組間新生兒 GSTT1 與 GSTM1 基因型的分布，經由卡方檢定後無統計上的顯著差異。

NAT2 基因型分為快型與慢型(79.41%和 20.59%)，在非吸菸組分別占 80.43%、19.57%，二手菸組分別為 78.79%、21.21%，吸菸組分別為 76.92%、23.08%，而三組經由卡方檢定沒有統計上的顯著差異( $p=0.936$ )。

## (二) 孕婦菸害暴露的程度與新生兒彗星試驗結果的比較(見表六)

以目視判定方法，母親為非吸菸組的新生兒 DNA 損傷積分最低為 53.96，其次是吸菸組為 58.53，最嚴重的為二手菸組為 69.73。在多樣本比較中，變異數分析與 Kruskal-Wallis Test 兩種檢定都具有統計上的顯著差異( $p=0.015$  和  $p=0.030$ )。在雙樣本比較中，只有二手菸暴露組新生兒的 DNA 損傷積分顯著高於非吸菸組。

以影像分析方法來說，新生兒 DNA 損傷積分的順序由大到小依然是二手菸暴露組、吸菸組與非吸菸組，平均損傷積分各別為 64.37、62.04 及 53.80，但不論是雙樣本比較或是多樣本比較，其平均值及中位數都不具統計上的顯著差異。

另一個影像分析的指標「頭部與尾巴拖曳長軸之比值」呈現於表七，頭部與尾巴拖曳長軸之比值越大代表 DNA 受損越嚴重，而非吸菸組、二手菸組與吸菸組平均比值各為 2.09、1.95 及 3.05，顯示二手菸組新生兒 DNA 損傷比非吸菸組輕，非吸菸組又比吸菸組輕，與預期的趨勢不符合，但經由變異數分析與 Kruskal-Wallis Test 檢定都不具統計上的顯著意義。

由新生兒彗星試驗「DNA 損傷積分」部分的結果，可以清楚的顯現出母親暴露於二手菸對新生兒 DNA 損傷程度的影響最為嚴重，而且以目視判定方法及影像分析方法所計算的 DNA 損傷積分結果相當一致，這兩種測量方法之間也有不錯的相關性(Spearman 相關係數=0.82， $p\text{-value}<0.01$ )。本文此後的分析一律使用目視判定方法計算 DNA 損傷積分。

## (三) 母親菸害暴露程度、新生兒代謝基因與 DNA 損傷的關係

利用線性迴歸分析來探討母親菸害暴露程度與新生兒 DNA 損傷積分的關係(如表八)。在簡單線性迴歸中，二手菸暴露組的新生兒 DNA 損傷積分顯著的高於未曾吸

菸組的新生兒 15.77，吸菸組亦比非吸菸組新生兒高 4.57，但無統計上的顯著意義。同時調整 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 及 NAT2 四個基因後，二手菸暴露組的新生兒 DNA 損傷積分比非吸菸組的新生兒多 16.91( $p=0.015$ )；而吸菸組 DNA 損傷積分高於非吸菸組新生兒，但依然無統計上的顯著意義。由此結果發現，調整代謝基因後新生兒 DNA 損傷積分變化不大，且孕婦吸入二手菸比吸菸對新生兒 DNA 造成更嚴重的損傷。

#### (四) 新生兒 DNA 損傷出生結果之關係圖【圖一~圖四】

以無母數迴歸的局部平滑估計呈現新生兒 DNA 損傷與出生結果之關係，就出生體重而言，隨著 DNA 損傷積分越高，體重有呈現緩降的趨勢，且損傷積分約大於 50 分時，出生體重隨著 DNA 損傷積分上升而下降的趨勢更為明顯。就出生身長而言，出生身長隨著 DNA 損傷積分增加而產生的變化波動似乎不多，大概都介於 50~52 公分間。但是可以發現在損傷積分約為 50 時，出生身長微微升高而後才又緩緩的下降。以出生頭圍和胸圍而言，其結果亦類似。故可根據以上之分析，以 DNA 損傷積分 50 及 100 的地方做為切點。整體而言，隨著 DNA 損傷程度越高，出生結果較往負向發展；若僅以 DNA 損傷積分 50 為切點，將 DNA 損傷分為輕度損傷( $\leq 50$ )及高度損傷( $>50$ )兩組時，高度損傷組的出生結果明顯地較差。

#### (五) 孕婦菸害暴露狀態對新生兒出生結果的影響

由以上的結果顯示，新生兒 DNA 損傷程度會影響新生兒的出生結果，而新生兒 DNA 損傷程度也剛好與孕婦菸害暴露狀態有關，符合了干擾因子的定義。因此，以分層分析法(stratified analysis)控制干擾因子--「新生兒 DNA 損傷程度」，探討孕婦菸害暴露狀態對新生兒出生結果的影響。

DNA 損傷程度以輕度損傷( $\leq 50$ )及高度損傷( $>50$ )做分層(如表九)，就輕度損傷層來說，吸菸組新生兒的頭圍平均比非吸菸組大 1.59 公分，具有統計上的顯著差異( $p=0.023$ )；調整其它可能的潛在因子後，吸菸組新生兒平均出生體重及頭圍顯著大

於非吸菸組。

在高度損傷層中，以新生兒出生體重而言，二手菸暴露組比非吸菸組的平均體重低 166.75 克，吸菸組也比非吸菸組體重低 411.82 克，都達到統計上的顯著差異( $p=0.040$ ， $p=0.011$ )。在迴歸模型中調整基本人口學資料顯著( $p<0.05$ )的變項後，平均出生體重二手菸暴露組與吸菸組的依然顯著的低於非吸菸組的新生兒( $p=0.002$ ， $p=0.040$ )。且經由趨勢檢定( $p=0.002$ )結果證明，新生兒出生體重與孕婦菸害暴露狀態具有劑量關係效應(dose-response)。以新生兒出生身長而言，二手菸暴露組平均身長顯著的小於非吸菸組新生兒( $p=0.025$ )，而吸菸組比非吸菸組的新生兒平均身長小 1.16 公分，但不具統計上顯著意義。調整孕婦年齡、懷孕週數、職業、教育及喝酒習慣後，非吸菸組比二手菸暴露組的新生兒高出 1.25 公分，比調整前差異更大，亦具有統計上顯著意義。但吸菸組與非吸菸組的新生兒身長之差異依然不顯著。以新生兒出生頭圍而言，二手菸暴露組比非吸菸組的平均頭圍小 0.87 公分，吸菸組也比非吸菸組的頭圍小 1.57 公分，都達到統計上的顯著差異。調整其它可能的潛在因子後，二手菸暴露組新生兒頭圍的平均值比非吸菸組新生兒小 0.94 公分，吸菸組新生兒比非吸菸組小 1.47 公分，且都具有統計上顯著差異。也顯示出新生兒出生頭圍與孕婦菸害暴露狀態具有劑量關係效應( $p=0.003$ )。以新生兒出生胸圍而言，非吸菸組新生兒的平均胸圍比二手菸暴露組大 0.47 公分，但不具顯著意義。而非吸菸組新生兒平均胸圍顯著的比吸菸組新生兒大 1.51 公分。調整孕婦年齡、懷孕週數、職業、教育及喝酒習慣後，雖然二手菸組與非吸菸組新生兒胸圍差異比調整前大，但依然不具統計上的顯著差異。而吸菸組在調整後比非吸菸組平均胸圍小 1.27 公分，這樣的差異接近統計上的顯著意義。



## 第五章、討論

### 第一節、研究對象的特性

在這個研究中孕婦的人口學變項分布與溫等人<sup>(22)</sup>調查 2001 年台灣吸菸行為的結果相似。像是台灣女性學歷在國中以下的吸菸率最高，之後吸菸率會隨著教育程度的增加而遞減。而男性的吸菸率會隨著收入的增加而降低，但在女性這樣的趨勢並不明顯，與我們的結果相符合。

### 第二節、關於 CYP2A6 基因之頻率與其代謝能力

細胞色素 P450 2A6 是肝臟內主要將尼古丁代謝成可丁寧的細胞色素，不同種族的 CYP2A6 對偶基因頻率分布不同，使得不同的種族對尼古丁的代謝力也有差異<sup>(13)</sup>。目前已知的 CYP2A6 對偶基因「至少」有八種如 CYP2A6\*1A、\*1B、\*4、\*7、\*9、\*10 及\*11，而整段缺失的對偶基因 CYP2A6\*4 又可分為 CYP2A6\*4B 及\*4C 兩種<sup>(49)</sup>。近年來有不少研究者探討 CYP2A6 對偶基因、種族與代謝尼古丁能力的相關性。Yoshida 等人<sup>(50)</sup>的研究發現 CYP2A6\*1A、\*1B、\*4、\*5、\*7、\*8 及\*10 之對偶基因頻率在日本人的分布為 42.4%、27.7%、20.1%、0%、6.5%、2.2%及 1.1%，在韓國人的分布為 45.9%、37.1%、11.0%、0.5%、3.6%、1.4%及 0.5%，而日本與韓國都無 CYP2A6\*2、CYP2A6\*3 與 CYP2A6\*6 對偶基因。Oscarson 等人(1999)發現 CYP2A6\*1A、CYP2A6\*1B 與 CYP2A6\*4 對偶基因頻率在西班牙人為 66.5、30.0 和 0.5%，而中國人的頻率分別為 43.2%、40.6%和 15.1%<sup>(37,38)</sup>。

雖然在日本及韓國都沒有發現 CYP2A6\*2 與\*3 的對偶基因，但 CYP2A6\*2 對偶基因頻率在瑞典、芬蘭、西班牙、德國及中國分別為 1.1%、1.4%、3.0%、2.3%及 0%<sup>(38, 51, 52)</sup>；CYP2A6\*3 對偶基因頻率在西班牙、德國及中國分別為 0%、1.4%及 0.7%<sup>(13, 37, 52)</sup>。可以發現亞洲人的對偶基因頻率較為相似，主要以 CYP2A6\*1A、

CYP2A6\*1B 與 CYP2A6\*4 對偶基因為主，且 CYP2A6\*4 對偶基因出現的頻率都較西班牙人高。另外，雖然亞洲人對偶基因頻率較為相似，但依然存在著些許的差異。在本研究當中，孕婦 CYP2A6\*1A、\*1B 及 \*4C 之對偶基因頻率分別為 0.36、0.17 和 0.47，新生兒對偶基因 CYP2A6\*1A、\*1B 及 \*4C 之頻率分別為 0.27、0.13 及 0.60。發現 CYP2A6\*4C 的頻率也高於西班牙人，與文獻的結果一致。但母子之間的對偶基因分布顯著的不同，可能是 CYP2A6\*3、CYP2A6\*5、CYP2A6\*7、CYP2A6\*8 及 CYP2A6\*10 等對偶基因型的存在而導致錯誤分組。將來可以進一步的探討台灣人 CYP2A6\*3、CYP2A6\*5、CYP2A6\*7、CYP2A6\*8 及 CYP2A6\*10 等對偶基因的頻率。

Nakajima 等人<sup>(13)</sup>於 2001 年探討個體間尼古丁代謝力的差異與 CYP2A6 基因多型性的相關中發現，CYP2A6\*4C/4C 的個體缺乏可丁寧形成，因此 CYP2A6\*4C 異型合子的代謝能力較低；另外，1A/1B 尼古丁的代謝能力優於 1A/1A。由此推測 CYP2A6 對偶基因的代謝能力應依序為 CYP2A6\*1B、CYP2A6\*1A、CYP2A6\*4C，與我們的研究結果在“趨勢”上是相似的。也就是新生兒至少帶有一個變異型對偶基因 (CYP2A6\*1B/1B、1A/1B、1B/4C) 的臍帶血可丁寧濃度最高，其次是至少帶有一個野生型對偶基因 (CYP2A6\*1A/1A、1A/4C) 與整段缺失 (CYP2A6\*4C/4C)，但差異並不顯著。可能的原因有兩個：

(1) 受其他可能存在的對偶基因影響。像是 Yoshida 等人<sup>(50)</sup>的研究顯示擁有 CYP2A6\*4、CYP2A6\*7 及 CYP2A6\*10 對偶基因同型合子或異型合子的個體缺乏細胞色素 2A6 的活性。

(2) 尼古丁半衰期很短(約 2.6 小時)<sup>(53)</sup>。在此研究中無法測量尼古丁濃度，僅測得臍帶血可丁寧濃度；因此，無法計算可丁寧與尼古丁濃度的比值(cotinine/nicotine ratio)，而不能預估 CYP2A6 基因多型性尼古丁的代謝能力。

### 第三節、孕婦菸害暴露的情形與新生兒的出生結果

在本研究中，懷孕婦女的菸害暴露與新生兒出生體重及身長的相關性，只有在孕婦暴露於二手菸時會使得新生兒平均頭圍較顯著地小於非吸菸組，但並未發現孕婦吸菸與新生兒出生頭圍的相關性。Goel 等人<sup>(54)</sup>的研究顯示暴露於二手菸的孕婦其新生兒平均出生體重比非吸菸者輕 362 公克。Lazzaroni 等人<sup>(55)</sup>提出非吸菸孕婦的新生兒其平均出生體重、身長較吸菸者重 123.7 公克且長 0.3 公分，也比暴露二手菸者重 51.4 公克以及長 0.3 公分；但非吸菸孕婦的新生兒其平均出生頭圍比吸菸及暴露二手菸者大約寬 0.1 到 0.2 公分( $p < 0.10$ )<sup>(55)</sup>。在本研究中，調整其他干擾因子之後，母親暴露於二手菸比母親非吸菸的新生兒平均出生體重輕 55.07 公克且身長小 0.41 公分，雖未達到統計上的顯著，但與其它研究的結果相似。

另外，無法觀察到孕婦吸菸與新生兒出生結果相關的原因，主要原因至少有兩個。其一是吸菸組的樣本數不足，導致估計上的變異性增大或統計檢定力(power)降低。其二是吸菸組中仍包含曾經吸菸的孕婦，而低估了吸菸對新生兒出生結果的影響；因為過去 Li 等人<sup>(11)</sup>的研究曾發現戒菸孕婦的新生兒平均出生體重比降低吸菸量者多 167 公克，甚至比吸菸孕婦的新生兒重 241 公克。

### 第四節、孕婦菸害暴露、新生兒代謝基因、DNA 損傷與出生結果的關係

彗星試驗是近年來發展的實驗技術，也是測量細胞 DNA 損傷的程度的方法，而且相較於姐妹染色體互換及染色體變異頻率的測量是一種省時省力又容易操作的方法。至今尚無研究者利用彗星試驗來探討新生兒 DNA 損傷程度與孕婦暴露於菸害環境的相關性。本研究首次利用彗星試驗測量新生兒 DNA 損傷的程度，結果發現母親吸菸或暴露於二手菸其新生兒 DNA 損傷積分皆高於母親非吸菸的新生兒 ( $p = 0.030$ )，與其他利用姐妹染色體互換或染色體變異頻率的測量方式結果相似。像是 Chica 等人<sup>(45)</sup>發現母親在懷孕期間吸菸的新生兒臍帶血染色體轉位的頻率明顯的較高。其它較早的研究亦顯示吸菸的母親其胎兒有較嚴重的 DNA 損傷程度<sup>(15, 43, 45)</sup>。

Pluth 等人<sup>(45)</sup>的研究是初次探討胎兒代謝基因型和母親吸菸對新生兒染色體損傷的影響，發現新生兒 CYP1A1 基因多型性與染色體轉位(translocation)的頻率具有顯著的關聯性，但此關聯性並未在新生兒 GSTT1、GSTM1、NAT2 等基因多型性中被觀察到；因為孕婦吸菸資料及新生兒基因多型性同時取得的人數有限，無法連接母親吸菸、新生兒基因型與染色體轉位頻率的關係。我們的研究克服 Pluth 等人研究的缺點，觀察到新生兒 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 和 NAT2 基因多型性與 DNA 損傷程度相關性微弱，反而是母親吸菸或暴露二手菸對新生兒 DNA 損傷的影響較大，成功的連結母親吸菸、新生兒基因型與 DNA 損傷的關係。

母親在懷孕期間暴露於菸害環境中與新生兒 DNA 損傷的關係，在本研究與其他相關的研究結果一致<sup>(15, 43, 45)</sup>。香菸的暴露主要是造成 DNA 複製過程或修復機制出錯而產生的染色體不穩定性<sup>(15)</sup>。但我們也發現 15 位吸菸孕婦中有七位新生兒 DNA 損傷積分小於五十分，這可能跟胎兒本身的易感受性以及修復能力有關。因此，將來可以更進一步的探討新生兒修補基因(repair gene)與 DNA 損傷程度的關係。

Perera 等人<sup>(56)</sup>研究以 PAH-DNA adducts 為 DNA 損傷的指標，發現 PAH-DNA 鍵結物與暴露環境二手菸不會單獨對新生兒的成長造成影響，但鍵結物若與暴露環境二手菸同時發生就會降低胎兒的出生體重及頭圍。這與本研究結果相似；新生兒出生結果與 DNA 損傷之間呈現負相關；尤其當新生兒 DNA 為高度損傷時，新生兒的出生體重、身長及頭圍都明顯的較低。若考慮母親菸害的暴露情形，二手菸暴露組的新生兒出生體重、身長及頭圍顯著的小於非吸菸組新生兒。尤其是出生體重及頭圍會隨母親菸害暴露程度增加而有明顯的下降趨勢。

## 第六章、結論

本研究由兩個假說探討孕婦菸害暴露的情形與新生兒出生結果的相關。考慮母子 CYP2A6 基因多型性的修飾作用後，發現母親懷孕期間暴露於二手菸與新生兒出生頭圍較窄有關。過去文獻指出 CYP1A1、GSTT1、GSTM1 及 NAT2 四種多型性代謝基因與新生兒 DNA 損傷及出生結果有關，但在本研究中並未發現這樣相關。資料顯示暴露二手菸組的新生兒 DNA 損傷基因明顯的高於非吸菸組，表示彗星試驗結果可以反映受菸害暴露的新生兒 DNA 損傷程度。另一方面，當 DNA 為高度損傷時，二手菸暴露組之新生兒有較差的出生體重、身長及頭圍。

由本研究結果建議：除了宣導婦女在懷孕過程中應全程戒菸外，也需要加強孕婦二手菸防治的工作。未來的研究，亦可進一步探討新生兒 DNA 損傷程度、新生兒修補基因與成長過程中疾病發生率(例如，氣喘、心血管疾病、癌症等)等的相關性。



## 參考文獻

1. WHO. Gender , Health and Tobacco. *Gender and Health 2003*.
2. 行政院衛生署：18 歲以上人口吸菸率。台灣地區 2010 年衛生指標白皮書, 2005:39.
3. Wen CP, Cheng TY, Lin CL, et al. The health benefits of smoking cessation for adult smokers and for pregnant women in Taiwan. *Tob Control 2005*;14 Suppl 1:i56-61.
4. 吳芳鵞: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報告，2004。(補助計畫:BHP-92-Anti-Tobacco-F204).
5. Wen CP, Cheng TY, Eriksen MP, Tsai SP, Hsu CC. The impact of the cigarette market opening in Taiwan. *Tob Control 2005*;14 Suppl 1:i4-9.
6. Vogler GP, Kozlowski LT. Differential influence of maternal smoking on infant birth weight: gene-environment interaction and targeted intervention. *JAMA 2002*;287:241-2.
7. Kallen K. The impact of maternal smoking during pregnancy on delivery outcome. *Eur J Public Health 2001*;11:329-33.
8. Pringle PJ, Geary MP, Rodeck CH, Kingdom JC, Kayamba-Kay's S, Hindmarsh PC. The influence of cigarette smoking on antenatal growth, birth size, and the insulin-like growth factor axis. *J Clin Endocrinol Metab 2005*;90:2556-62.
9. Kharrazi M, DeLorenze GN, Kaufman FL, et al. Environmental tobacco smoke and pregnancy outcome. *Epidemiology 2004*;15:660-70.
10. Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers.

- Dev Pharmacol Ther* 1985;8:384-95.
11. Li CQ, Windsor RA, Perkins L, Goldenberg RL, Lowe JB. The impact on infant birth weight and gestational age of cotinine-validated smoking reduction during pregnancy. *JAMA* 1993;269:1519-24.
  12. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; 287:195-202.
  13. Nakajima M, Kwon JT, Tanaka N, et al. Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:72-8.
  14. Hoffmann H, Hogel J, Speit G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2005;20:455-66.
  15. de la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA* 2005;293:1212-22.
  16. Rowland RE, Harding KM. Increased sister chromatid exchange in the peripheral blood lymphocytes of young women who smoke cigarettes. *Hereditas* 1999;131:143-6.
  17. Littlefield LG, Joiner EE. Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of long-term heavy smokers. *Mutat Res* 1986;170:145-50.
  18. Hoffmann H, Isner C, Hogel J, Speit G. Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 2005;20:359-64.
  19. Donna L. Hoyert TJM, Fay Menacker, Donna M. Strobino and Bernard Guyer. Annual Summary of Vital Statistics: 2004. *Pediatrics* 2006;117:168-183.
  20. Nakamura MU, Alexandre SM, Kuhn dos Santos JF, et al. Obstetric and

- perinatal effects of active and/or passive smoking during pregnancy. *Sao Paulo Med J* 2004;122:94-8.
21. <http://www.doh.gov.tw/cht/index.aspx>: 行政院衛生署.
  22. Wen CP, Levy DT, Cheng TY, Hsu CC, Tsai SP. Smoking behaviour in Taiwan, 2001. *Tob Control* 2005;14 Suppl 1:i51-5.
  23. Wen CP, Tsai SP, Chen CJ, Cheng TY. The mortality risks of smokers in Taiwan: Part I: cause-specific mortality. *Prev Med* 2004;39:528-35.
  24. Lannero E, Wickman M, Pershagen G, Nordvall L. Maternal smoking during pregnancy increases the risk of recurrent wheezing during the first years of life (BAMSE). *Respir Res* 2006;7:3.
  25. Jaakkola JJ, Gissler M. Maternal smoking in pregnancy, fetal development, and childhood asthma. *Am J Public Health* 2004;94:136-40.
  26. Lieberman E, Gremy I, Lang JM, Cohen AP. Low birthweight at term and the timing of fetal exposure to maternal smoking. *Am J Public Health* 1994;84:1127-31.
  27. Jaakkola JJ, Jaakkola N, Zahlsen K. Fetal growth and length of gestation in relation to prenatal exposure to environmental tobacco smoke assessed by hair nicotine concentration. *Environ Health Perspect* 2001;109:557-61.
  28. Martin TR, Bracken MB. Association of low birth weight with passive smoke exposure in pregnancy. *Am J Epidemiol* 1986;124:633-42.
  29. 陳培君, 李中一, 林瑞雄, 宋鴻樟。婦女抽菸及二手菸暴露和低出生體重嬰兒。 *台灣衛誌* 2002;21:321-328.
  30. Keyler D, Pentel PR, Kuehl G, Collins G, Murphy SE. Effects of nicotine infusion on the metabolism of the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in rats. *Cancer Lett* 2003;202:1-9.



31. Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, Kloza EM, Wald NJ. Cigarette consumption and serum cotinine in relation to birthweight. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:678-81.
32. Eskenazi B, Prehn AW, Christianson RE. Passive and active maternal smoking as measured by serum cotinine: the effect on birthweight. *Am J Public Health* 1995;85:395-8.
33. England LJ, Kendrick JS, Gargiullo PM, Zahniser SC, Hannon WH. Measures of maternal tobacco exposure and infant birth weight at term. *Am J Epidemiol* 2001;153:954-60.
34. Nakajima M, Yamagishi S, Yamamoto H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Deficient cotinine formation from nicotine is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67:57-69.
35. Benowitz NL, Jacob P, 3rd, Sachs DP. Deficient C-oxidation of nicotine. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:590-4.
36. Cholerton S, Arpanahi A, McCracken N, et al. Poor metabolisers of nicotine and CYP2D6 polymorphism. *Lancet* 1994;343:62-3.
37. Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, et al. Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism. *FEBS Lett* 1999;460:321-7.
38. Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, et al. Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population. *FEBS Lett* 1999;448:105-10.
39. Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tob Control* 2003;12:424-30.
40. Hong YC, Lee KH, Son BK, Ha EH, Moon HS, Ha M. Effects of the GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the relationship between maternal exposure

- to environmental tobacco smoke and neonatal birth weight. *J Occup Environ Med* 2003;45:492-8.
41. Nukui T, Day RD, Sims CS, Ness RB, Romkes M. Maternal/newborn GSTT1 null genotype contributes to risk of preterm, low birthweight infants. *Pharmacogenetics* 2004;14:569-76.
42. Karaoguz MY, Cosar B, Arikan Z, Basaran F, Menevse A, Menevse S. Increased frequency of sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of alcoholics and cigarette smokers. *Cell Biol Int* 2005; 29:165-8.
43. Shulman LP, Elias S, Tharapel AT, Li LR, Phillips OP, Simpson JL. Sister chromatid exchange frequency in directly prepared cytotrophoblasts: demonstration of in vivo deoxyribonucleic acid damage in pregnant women who smoke cigarettes. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1877-80.
44. Salonen K, Lahdetie J. No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat Res* 1993;298:285-9.
45. Pluth JM, Ramsey MJ, Tucker JD. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res* 2000;465:101-11.
46. Ariyoshi N, Takahashi Y, Miyamoto M, et al. Structural characterization of a new variant of the CYP2A6 gene (CYP2A6\*1B) apparently diagnosed as heterozygotes of CYP2A6\*1A and CYP2A6\*4C. *Pharmacogenetics* 2000;10:687-93.
47. 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.

48. 邱顯財。孕婦吸菸與暴露二手菸對其胎兒出生結果的影響。中國醫藥大學環境醫學研究所碩士論文, 2005.
49. Fujieda M, Yamazaki H, Saito T, et al. Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers. *Carcinogenesis* 2004;25:2451-8.
50. Yoshida R, Nakajima M, Watanabe Y, Kwon JT, Yokoi T. Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54:511-7.
51. Oscarson M, Gullsten H, Rautio A, et al. Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBS Lett* 1998;438:201-5.
52. Bourian M, Gullsten H, Legrum W. Genetic polymorphism of CYP2A6 in the German population. *Toxicology* 2000;144:129-37.
53. Tricker AR. Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 2003;183:151-73.
54. Goel P, Radotra A, Singh I, Aggarwal A, Dua D. Effects of passive smoking on outcome in pregnancy. *J Postgrad Med* 2004;50:12-6.
55. Lazzaroni F, Bonassi S, Manniello E, et al. Effect of passive smoking during pregnancy on selected perinatal parameters. *Int J Epidemiol* 1990;19:960-6.
56. Perera FP, Tang D, Rauh V, et al. Relationships among polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, proximity to the World Trade Center, and effects on fetal growth. *Environ Health Perspect* 2005;113:1062-7.

表一、孕婦與新生兒之基本人口學資料

	非吸菸組 (n=175)	二手菸組 (n=184)	吸菸組 (n=24)	全體 (n=383)	ANOVA p-value	卡方檢定 p-value	等級和檢定 p-value
<b>孕婦</b>							
年齡(歲)	30.9(4.0)	29.5(4.8)	28.6(5.8)	30.1(4.6)	<b>0.003</b>		<b>0.001</b>
懷孕前 BMI	21.2(3.0)	21.3(2.9)	20.9(3.9)	21.2(3.0)	0.861		0.338
懷孕週數(週)	39.1(1.3)	39.4(1.2)	38.7(1.4)	39.2(1.3)	<b>0.035</b>		0.067
職業*						<b>0.005</b>	
家庭主婦	74(43.0)	48(26.8)	10(43.5)	132(35.3)			
非家庭主婦	98(57.0)	131(73.2)	13(56.5)	242(64.7)			
教育程度*						<b>&lt;.001</b>	
國中以下	5(2.9)	13(7.1)	4(16.7)	22(5.7)			
高中及專科	109(62.3)	140(76.1)	17(70.8)	266(69.5)			
大學以上	61(34.9)	31(16.9)	3(12.5)	95(24.8)			
全家月收入(NT \$)*						0.056	
≤40000	28(16.8)	35(20.0)	9(39.1)	72(19.7)			
40001~60000	50(29.9)	66(37.7)	7(30.4)	123(33.7)			
60001~80000	41(24.6)	40(22.9)	5(21.7)	86(23.6)			
>80000	48(28.4)	34(19.4)	2(8.7)	84(23.0)			
是否為第一胎						0.969	
否	82(47.7)	87(47.3)	12(50.0)	181(47.6)			
是	90(52.3)	97(52.7)	12(50.0)	199(52.4)			

表一、孕婦與新生兒之基本人口學資料(續)

	非吸菸組 (n=175)	二手菸組 (n=184)	吸菸組 (n=24)	全體 (n=383)	ANOVA p-value	卡方檢定 p-value	等級和檢定 p-value
飲酒習慣						<b>0.001</b>	
完全不喝	171(98.3)	175(96.69)	20(83.3)	366(96.6)			
以前喝或目前喝	3(1.7)	6(3.3)	4(16.7)	13(3.4)			
喝咖啡頻率						0.761	
無或偶爾	161(92.0)	166(91.2)	21(87.5)	348(91.3)			
常常或每天	14(8.0)	16(8.8)	3(12.5)	33(8.7)			
新生兒							
性別*						0.244	
男性	89(51.5)	106(59.9)	12(50.0)	207(55.4)			
女性	84(48.5)	71(40.1)	12(50.0)	167(44.7)			
出生體重(克)	3206.1(405.0)	3172.4(392.2)	3184.2(635.0)	3188.6(415.9)	0.746		0.409
出生身長(公分)	51.3(2.0)	50.8(2.2)	51.2(2.5)	50.9(2.1)	0.417		0.652
出生頭圍(公分)	33.5(1.6)	33.5(1.6)	33.6(1.8)	33.5(1.6)	0.917		0.962
出生胸圍(公分)	32.8(1.7)	32.9(1.7)	32.9(1.9)	32.8(1.7)	0.938		0.827

表二、CYP2A6 基因多型性與對偶基因之分布

CYP2A6 基因型	非吸菸組	二手菸組	吸菸組	全體	p-value <sup>†</sup>
<b>孕婦</b>					
對偶基因頻率					0.811
*1A	0.46	0.49	0.05	0.36	
*1B	0.49	0.49	0.02	0.17	
*4C	0.48	0.48	0.04	0.47	
對偶基因數(n×2)	242	246	22	510	
基因型別分佈					0.746 <sup>E</sup>
1A/1A	2(1.7)	4(3.3)	0(0.0)	6(2.4)	
1A/1B	5(4.1)	6(4.9)	1(9.1)	12(4.7)	1.000 <sup>§</sup>
1B/1B	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
1A/4C	75(62.0)	76(61.8)	9(81.8)	160(62.8)	
1B/4C	37(30.6)	36(29.3)	1(9.1)	74(29.0)	0.583 <sup>‡</sup>
4C/4C	2(1.7)	1(0.8)	0(0.0)	3(1.2)	
基因型別分佈*					0.701 <sup>E</sup>
整段缺失	2(1.7)	1(0.8)	0(0.00)	3(1.2)	
≥*1A	77(63.6)	80(65.0)	9(81.82)	166(65.1)	
≥*1B	42(34.7)	42(34.2)	2(18.18)	86(33.7)	
<b>新生兒</b>					
對偶基因頻率					0.079
*1A	0.23	0.30	0.32	0.27	
*1B	0.16	0.11	0.00	0.13	
*4C	0.60	0.59	0.68	0.60	
對偶基因數(n×2)	210	236	28	474	
基因型別分佈					0.103 <sup>E</sup>
1A/1A	1(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.4)	
1A/1B	0(0.0)	2(1.7)	0(0.0)	2(0.8)	0.400 <sup>§</sup>
1B/1B	2(1.9)	1(0.9)	0(0.0)	3(1.3)	
1A/4C	47(44.8)	68(57.6)	9(64.3)	124(52.3)	
1B/4C	30(28.6)	22(18.6)	0(0.0)	52(21.9)	0.043 <sup>‡</sup>
4C/4C	25(23.8)	25(21.2)	5(35.7)	55(23.2)	
基因型別分佈*					0.046 <sup>E</sup>
整段缺失	25(23.8)	25(21.2)	5(35.7)	55(23.2)	
≥*1A	48(45.7)	68(57.6)	9(64.3)	125(52.7)	
≥*1B	32(30.5)	25(21.2)	0(0.0)	57(24.1)	

<sup>§</sup>基因型 1A/1A、1A/1B 和 1B/1B 與菸害暴露情形之分布，使用 Fisher's Exact Test

<sup>‡</sup>基因型 1A/4C、1B/4C 和 4C/4C 與菸害暴露情形之分布，使用 Fisher's Exact Test

<sup>†</sup>卡方檢定之 p 值

<sup>E</sup> Fisher's Exact Test

\*≥\*1A(至少帶有一個野生型對偶基因): 1A/1A、1A/4C

≥\*1B(至少帶有一個變異型對偶基因): 1B/1B、1A/1B、1B/4C

整段缺失: 4C/4C

表三、新生兒 CYP2A6 基因與臍帶血可丁寧濃度之相關

基因型別 <sup>‡</sup>	分層分析					
	非吸菸組		二手菸組		吸菸組	
	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value
整段缺失	referent	--	referent	--	referent	--
≥*1A	0.47(0.6)	0.413	0.69(0.5)	0.143	-4.89(2.2)	0.076
≥*1B	0.78(0.6)	0.216	0.99(0.6)	0.080	.	.
	回歸分析(未分層)					
	單變項		調整菸害暴露狀態		調整其他因子*	
	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value
整段缺失	referent	--	referent	--	referent	--
≥*1A	0.20(0.4)	0.587	0.26(0.4)	0.475	0.27(0.4)	0.496
≥*1B	0.50(0.4)	0.256	0.67(0.4)	0.122	0.69(0.4)	0.119

\*調整孕婦年齡、懷孕週數、職業、教育、飲酒習慣及菸害暴露狀況

<sup>‡</sup>≥\*1A(至少帶有一個野生型對偶基因): 1A/1A 、 1A/4C

≥\*1B(至少帶有一個變異型對偶基因): 1B/1B 、 1A/1B 、 1B/4C

整段缺失: 4C/4C

表四、孕婦菸害暴露情形與新生兒出生結果之迴歸分析

變項	Model 1		Model 2		Model 3		Model 4	
	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value	β(SE)	p-value
出生體重								
非吸菸組	referent	--	referent	--	referent	--	referent	--
二手菸組	-34.24(44.5)	0.442	-26.15(50.3)	0.603	-80.21(73.8)	0.279	-55.07(44.4)	0.215
吸菸組	-28.39(92.9)	0.760	-12.53(108.8)	0.908	-25.88(154.6)	0.867	57.79(91.6)	0.528
出生身長								
非吸菸組	referent	--	referent	--	referent	--	referent	--
二手菸組	-0.25(0.2)	0.282	-0.17(0.3)	0.493	-0.32(0.4)	0.408	-0.41(0.2)	0.081
吸菸組	0.19(0.5)	0.701	0.12(0.5)	0.828	0.05(0.8)	0.951	0.31(0.5)	0.522
出生頭圍								
非吸菸組	referent	--	referent	--	referent	--	referent	--
二手菸組	-0.03(0.2)	0.871	-0.13(0.3)	0.627	-0.66(0.3)	<b>0.010</b>	-0.71(0.3)	<b>0.010</b>
吸菸組	0.04(0.4)	0.901	0.11(0.6)	0.857	-0.27(0.5)	0.613	0.16(0.6)	0.789

【註】 Model 1:單變項分析

Model 2:調整(a)出生體重:孕婦第二期血液及尿液可丁寧濃度

(b)出生身長:孕婦第二期尿液可丁寧濃度

(c)出生頭圍:孕婦第一期血液可丁寧濃度

Model 3:調整孕婦及其新生兒 CYP2A6 之基因多型性(整段缺失、至少帶有一個野生型對偶基因、至少帶有一個變異型對偶基因)

Model 4:調整孕婦年齡、懷孕週數、職業、教育程度、飲酒習慣以及 Model 2、3 統計上具顯著意義(p<0.05)之變項



表五、四種代謝基因多型性之分布

	非吸菸組	二手菸組	吸菸組	全體	卡方檢定 p-value
<b>CYP1A1 MspI</b>					0.249
野生/野生	44(46.8)	61(58.7)	8(53.3)	113(53.1)	
野生/變異或變異/變異	50(53.2)	43(41.4)	7(46.7)	100(47.0)	
<b>GSTM1</b>					0.182
非無效型	52(55.3)	58(55.8)	12(80.0)	122(57.3)	
無效型	42(44.7)	46(44.2)	3(20.0)	91(42.7)	
<b>GSTT1</b>					0.367
非無效型	50(53.2)	55(52.9)	11(73.3)	116(54.5)	
無效型	44(46.8)	49(47.1)	4(26.7)	97(45.5)	
<b>NAT2</b>					0.936
快型	74(80.4)	78(78.8)	10(76.9)	162(79.4)	
慢型	18(19.6)	21(21.2)	3(23.1)	42(20.6)	



表六、孕婦菸害暴露與新生兒 DNA 損傷積分之比較

	DNA 損傷積分				t 統計量或 F 統計量 <sup>§</sup>	p-value	z 統計量或 $\chi^2$ 統計量 <sup>‡</sup>	p-value	比較方式*
	個數	平均值	標準差	中位數					
目視判定方法									
非吸菸組	94	54.0	33.8	48.8	<b>-2.91<sup>U</sup></b>	<b>0.004</b>	<b>-2.61</b>	<b>0.009</b>	N-E
二手菸組	104	69.7	42.3	59.8	0.98	0.329	-0.94	0.349	E-S
吸菸組	15	58.5	34.3	52.9	-0.49	0.628	0.63	0.529	S-N
					<b>4.27</b>	<b>0.015</b>	<b>7.05</b>	<b>0.030</b>	多樣本
影像分析方法									
非吸菸組	91	53.8	40.5	41.3	-1.65	0.101	-1.64	0.101	N-E
二手菸組	103	64.4	47.9	48.4	0.17	0.863	-0.09	0.929	E-S
吸菸組	15	62.0	53.8	49.2	-0.70	0.489	0.67	0.502	S-N
					1.34	0.265	2.74	0.255	多樣本

\*N: 非吸菸組(non-smoker) E: 二手菸暴露組(ETS) S: 吸菸組(smoker)

<sup>§</sup>有母數檢定統計量：雙樣本比較為獨立 t 檢定之 t 統計量(U：兩組變異數不相等)  
多樣本比較為 ANOVA 之 F 統計量

<sup>‡</sup>無母數統計檢定量：雙樣本比較為 Wilcoxon rank sum test 之 z 統計量  
多樣本比較為 Kruskal wallis test 之  $\chi^2$  統計量

表七、孕婦菸害暴露與新生兒彗星試驗頭部與尾巴拖曳長度比值之比較

	尾巴拖曳長度/頭部直徑				t 統計量或	p-value	z 統計量或	p-value	比較方式*
	個數	平均值	標準差	中位數	F 統計量 <sup>§</sup>		$\chi^2$ 統計量 <sup>‡</sup>		
非吸菸組	91	2.1	3.0	1.6	0.44 <sup>U</sup>	0.662	-1.75	0.080	N-E
二手菸組	103	2.0	0.6	1.7	-0.93 <sup>U</sup>	0.369	-0.13	0.897	E-S
吸菸組	15	3.0	4.5	1.7	-0.78 <sup>U</sup>	0.447	0.74	0.457	S-N
					1.36	0.258	3.14	0.208	多樣本

\*N: 非吸菸組(non-smoker) E:二手菸暴露組(ETS) S:吸菸組(smoker)

<sup>§</sup>有母數檢定統計量：雙樣本比較為獨立 t 檢定之 t 統計量(U：兩組變異數不相等)  
 多樣本比較為 ANOVA 之 F 統計量

<sup>‡</sup>無母數統計檢定量：雙樣本比較為 Wilcoxon rank sum test 之 z 統計量  
 多樣本比較為 Kruskal Wallis test 之  $\chi^2$  統計量



表八、孕婦菸害暴露情形與新生兒 DNA 損傷積分之迴歸分析

	線性迴歸		調整基因型 <sup>a</sup>	
	$\beta$ (SE)	p-value	$\beta$ (SE)	p-value
非吸菸組	referent	--	referent	--
二手菸組	15.8(5.4)	<b>0.004</b>	16.9(6.9)	<b>0.015</b>
吸菸組	4.6(10.6)	0.667	2.9(13.4)	0.826

<sup>a</sup>調整 CYP1A1、GSTT1、GSTM1、NAT2 之基因多型性

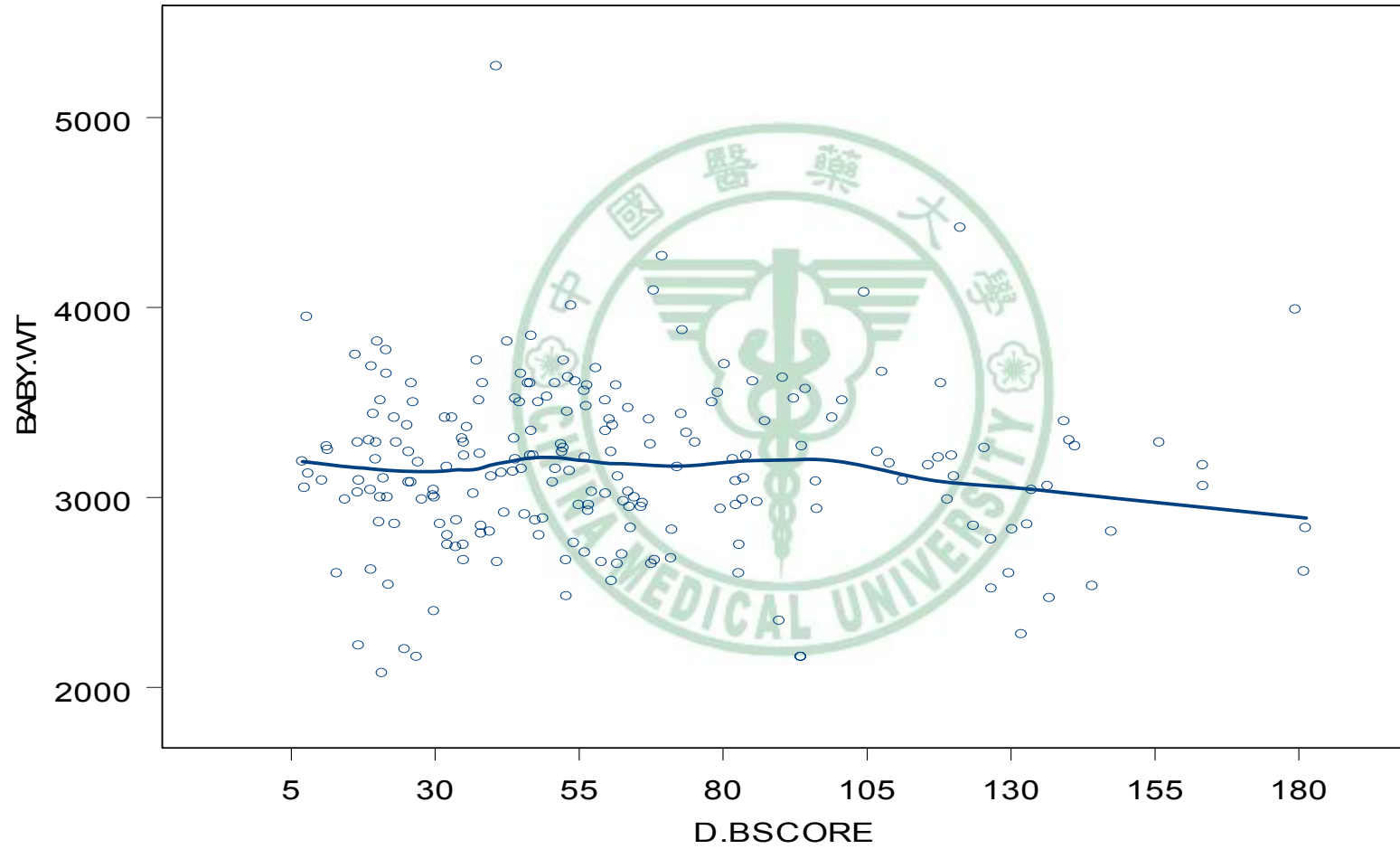


表九、孕婦菸害暴露狀態與出生結果之迴歸分析(以新生兒 DNA 損傷積分做分層)

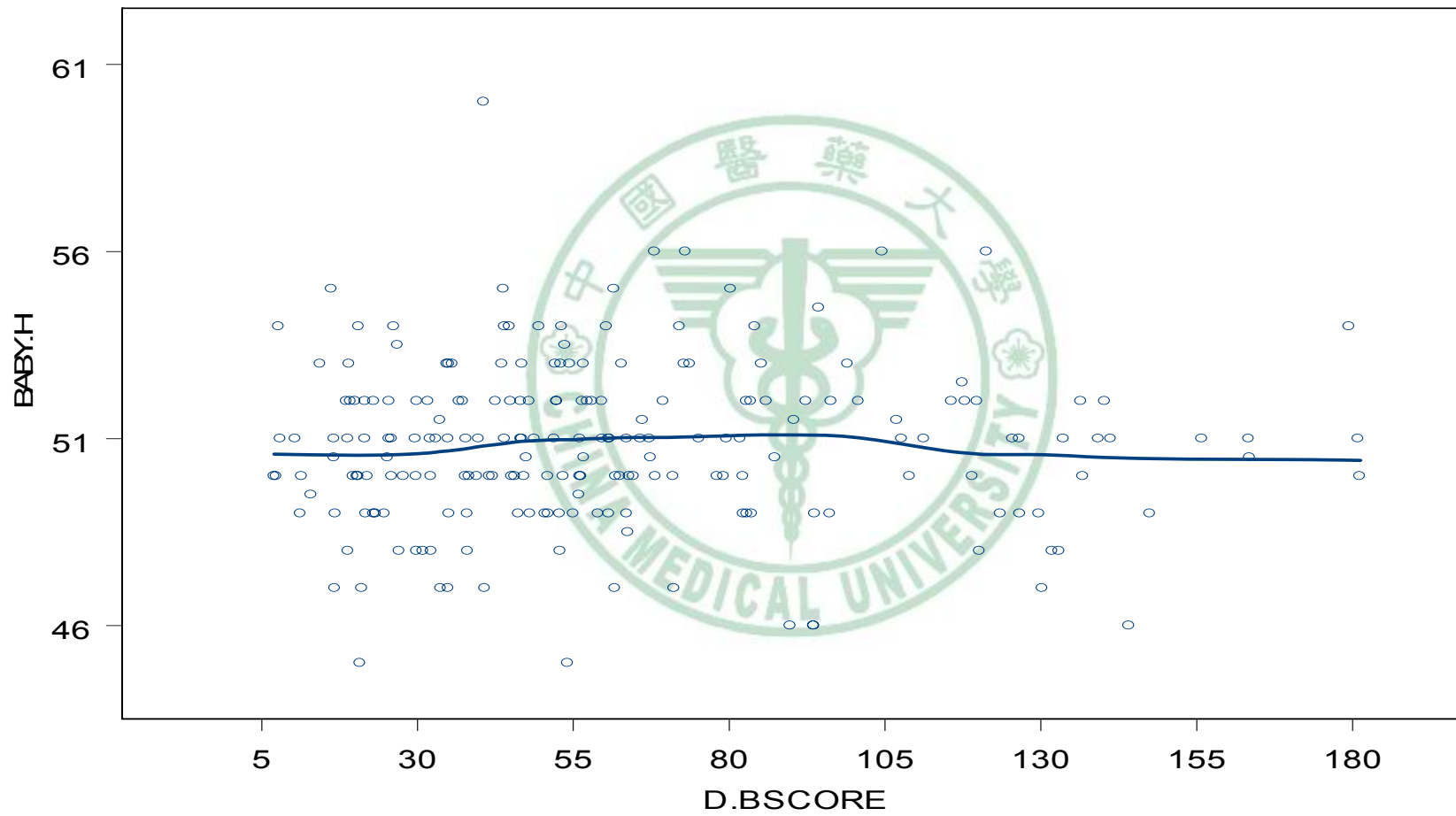
DNA 損傷 積分 <sup>§</sup>	線性迴歸				調整其它因子*		
	個數	β	SE	p-value	β	SE	p-value
<b>出生體重(g)</b>							
輕度損傷							
非吸菸組	48	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	40	2.7	94.0	0.977	52.0	100.7	0.607
吸菸組	7	334.1	177.7	0.063	513.6	204.2	<b>0.014</b>
高度損傷							
非吸菸組	46	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	64	-166.8	80.3	<b>0.040</b>	-262.2	82.8	<b>0.002</b>
吸菸組	8	-411.8	159.1	<b>0.011</b>	-335.1	160.8	<b>0.040</b>
<b>出生身長(cm)</b>							
輕度損傷							
非吸菸組	48	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	39	-0.4	0.5	0.366	-0.5	0.5	0.336
吸菸組	7	1.6	0.9	0.071	1.7	1.0	0.086
高度損傷							
非吸菸組	46	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	64	-1.0	0.4	<b>0.025</b>	-1.3	0.4	<b>0.006</b>
吸菸組	7	-1.2	0.9	0.189	-0.9	0.9	0.304
<b>出生頭圍(cm)</b>							
輕度損傷							
非吸菸組	47	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	40	0.2	0.4	0.667	0.2	0.4	0.548
吸菸組	7	1.6	0.7	<b>0.023</b>	2.0	0.8	<b>0.019</b>
高度損傷							
非吸菸組	46	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	64	-0.9	0.3	<b>0.004</b>	-0.9	0.3	<b>0.007</b>
吸菸組	8	-1.6	0.6	<b>0.009</b>	-1.5	0.7	<b>0.028</b>
<b>出生胸圍(cm)</b>							
輕度損傷							
非吸菸組	48	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	40	0.3	0.4	0.352	0.4	0.4	0.352
吸菸組	7	1.2	0.7	0.070	1.4	0.8	0.074
高度損傷							
非吸菸組	46	referent	--	--	referent	--	--
二手菸組	64	-0.5	0.3	0.151	-0.7	0.4	0.052
吸菸組	8	-1.5	0.7	<b>0.022</b>	-1.3	0.7	0.075

\*調整孕婦年齡、懷孕週數、職業、教育及喝酒習慣

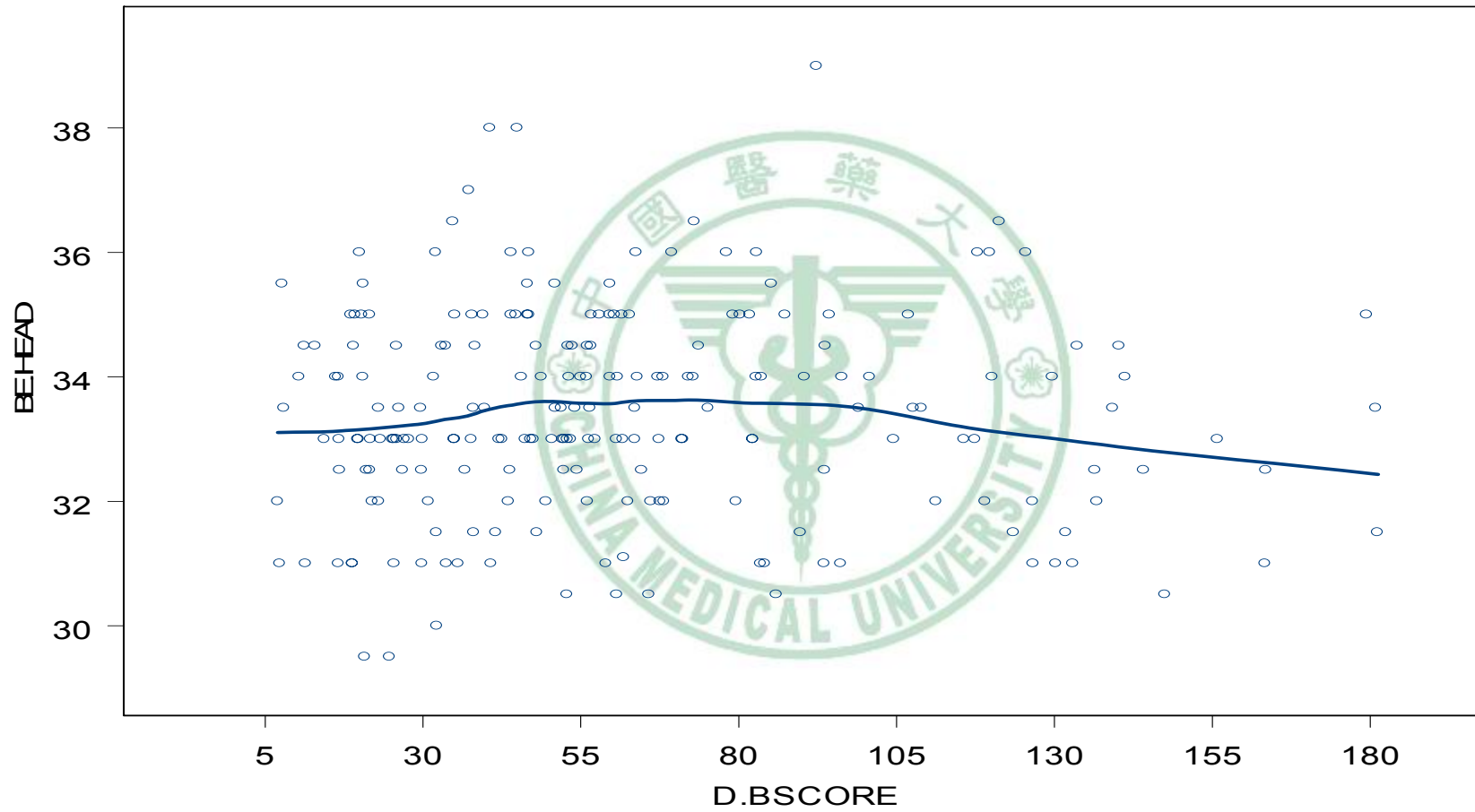
<sup>§</sup>DNA 損傷積分分為兩組:輕度損傷( $\leq 50$ )、高度損傷( $>50$ )



圖一、新生兒 DNA 損傷積分與出生體重之相關

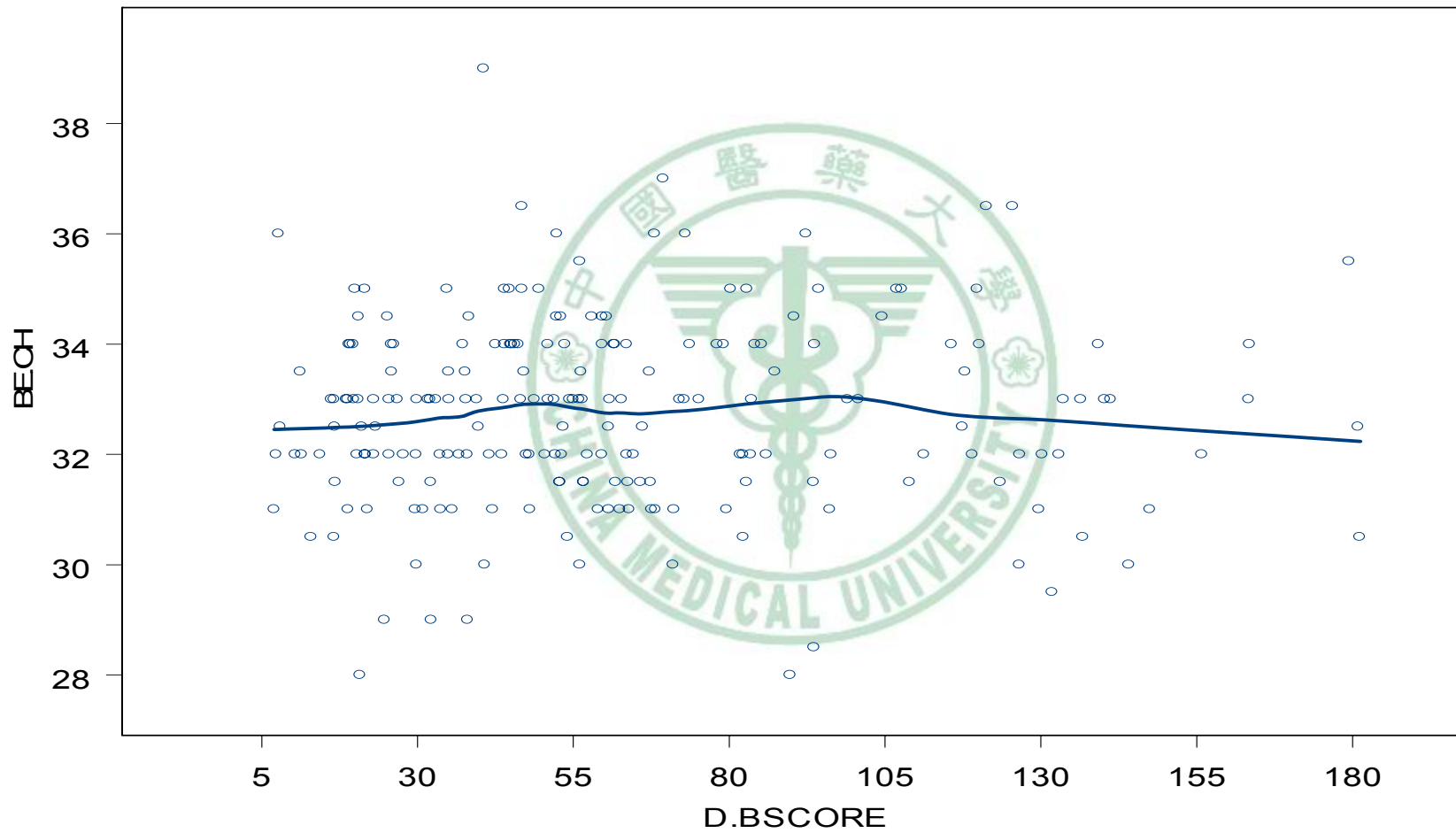


圖二、新生兒 DNA 損傷積分與出生身長之相關



圖三、新生兒 DNA 損傷積分與出生頭圍之相關





圖四、新生兒 DNA 損傷積分與出生胸圍之相關