

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 香煙中氮氧化合物及亞硝酸之毒性效應及其預防

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - EPA - Z - 038 - 001 -

執行期間： 88 年 07 月 01 日至 89 年 12 月 31 日

計畫主持人：何元順 副教授

共同主持人：林仁混 教授

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台北大學 生物醫學技術研究所

中 華 民 國 90 年 02 月 04 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89 - EPA - Z - 038 - 001 -

執行期限：88 年 07 月 01 日至 89 年 12 月 31 日

主持人：何元順 副教授 執行單位：台北醫學大學 生物醫學技術研究所

共同主持人：林仁混 教授 執行單位：台灣大學 生化學研究所

## 一、中文摘要

人類癌症的發生有許多複雜的因素(如藥物,病毒,輻射等)。其中日常飲食(佔 35%)與抽煙(佔 30%)則是兩項主要的致癌因子。吾人日常飲食所接觸到的致癌物質不勝枚舉,因此若想單獨就飲食層面來杜絕癌症的發生有相當的困難度存在。反之香煙中雖然含有至少 50 種以上的致癌物質,只要我們不去接觸卻可以輕易的杜絕因為香煙所造成的生命傷害。根據美國癌症學會(The American Cancer Society)所做調查估計,全美在 1994 年約有 153,000 人死於肺癌其中至少 80%是由於吸煙所造成的。因此若能杜絕吸煙的習慣確能減少肺癌的發生,只是由於吸煙有其文化與社會因素存在確實很難完全禁止。然而若能在另一方面積極的採取化學預防的方法,應能減少肺癌發生的危險性。

煙草燃燒過程所產生的有毒物質可分成兩大部分:氣體及固態物質(tar)。氣相部分主要有一氧化氮(nitric oxide, NO)與氮氧自由基(nitrogen oxides, NOx),固相部分則為 quinone / hydroquinone 等化合物,這兩部分均含有相當高濃度的致癌物質及自由基。NO 主要存在氣相部分而 O<sub>2</sub>•則主要是藉由固相物質如 catechol 及 1,4-hydroquinone 等化合物氧化後所產生。NO 與 O<sub>2</sub>•形成之 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)顯然與許多抽煙所造成的呼吸道疾病有密切的關聯。我們的結果指出人類癌細胞株在暴露於氣相 NO 以後,細胞內調控細胞週期的基因如 p53,及 p21/WAF1/CIP1 被誘導而大量表現,最後導致細胞凋亡

(apoptosis)的發生。我們的結果亦指出天然抗氧化物如 vitamin C, L-N-acetyl-cysteine 等均能有效抑制 NO 對人類細胞此種毒殺作用。最近我們更發現 peroxynitrite 亦可誘發人類肺癌細胞死亡,然而它與 NO 的作用機轉不同主要是誘發細胞壞死(necrosis)而非凋亡。由前面描述已知 peroxynitrite 為 NO 與 O<sub>2</sub>•形成之終產物,其存在空氣中的半衰期長,安定性佳,又可誘發細胞壞死產生。我們懷疑 peroxynitrite 的產生與許多常見的呼吸道疾病有一定程度的相關性。因此此本計劃希望能釐清香煙燃燒所產生的 NO, NOx,與 peroxynitrite 之致病機轉,及其預防之道。

本計劃完成幾項重要的結果,

- 一、我們證實香煙中所含 NO 氣體可以誘發人類癌細胞凋亡,其細胞毒性分子機轉已經釐清。
- 二、我們證實環境中某些污染物如銅離子會造成 NO 的毒性加劇,因此我們除了避免在日常生活中接觸香煙氣體,更必須提防環境中某些微量的化學物質對香煙中有害物質的加成傷害。
- 三、為了尋求環境中可能緩解此種 NO 所造成傷害的化學物質,我們也證實抗氧化物質如 L-N-acetyl-cysteine 可以緩解 NO 所造成的傷害,此機轉與提高細胞內抗氧化物質有關。
- 四、除此之外我們亦探討香煙中 nicotine 致癌的分子機制,我們證實肺癌細胞受到 nicotine 刺激後會活化細胞內訊息傳遞的許多蛋白,如 p38, ERK, JNK 等。

五、我們更進一步證實 ERK 蛋白與活化細胞週期調控蛋白 cyclin D1, D3, p27 有關，nicotine 的作用讓我們了解香煙中許多有毒物質可能致癌的機轉。

六、為了找尋環境中足以緩解 nicotine 作用的物質，我們證實綠茶中 EGCG 成分可以緩解 nicotine 的作用。本計劃除了探討 NO，nicotine 的毒性機轉，也提出可能緩解這些有毒物質的方式。

本計劃根據前述結果證實抽煙個體白血球中 ERK，JNK 的表現明顯的增加，我們的結果將提供其他研究學者作為人體暴露於香煙後血中的生物指標。將來我們希望進一步探討抽煙個體在改變飲食或停止抽煙一段期間後其血中 JNK，ERK 的量是否改變，此項結果將更能幫助我們對這項結果之確認。

**關鍵詞：**香煙，生物標幟，化學預防，氮氧化合物

### Abstract

Epidemiologic evidence suggests that cigarette smoking is a major factor for chronic obstructive pulmonary disease such as chronic bronchitis and emphysema, for carcinogenesis, and for cardiovascular disease. However, the precise mechanisms of these effects are incompletely understood. Cigarette smoke can be divided into two phases, gas phase and particulate matter (tar). Both phases contain high concentrations of oxidants and free radicals, especially nitric oxide (NO) and nitrogen oxides (Nox) in the gas phase and quinone/hydroquinone complex in the tar. NO is present in the gas phase of smoke, whereas O<sub>2</sub>• is generated by auto-oxidation of polyhydroxyaromatic compounds such as catechol and 1,4-hydroquinone present in the cigarette tar. Thus, potent reactive species including

peroxynitrite formed by the interaction between cigarette tar and NO may play an important role in smoking-related diseases including lung cancer. Our previous study indicated that wild-type p53 and p21/WAF1/CIP1 expression were elevated in human cancer cells exposed to NO and these elevations eventually promote cell apoptosis. Our another study also demonstrated that NO-induced alteration in gene expression was attenuated by antioxidants such as L-N-acetyl-cysteine. In addition, by use of lung cancer cell line as a model system, we demonstrated that peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) in contrast to NO, induced cell death more characteristic of necrosis than apoptosis. Hence, the compositions in cigarette smoke including NO, NO<sub>x</sub>, and peroxynitrite may induce some of its damaging effects by free radical mechanisms. All these results provide us for intend research and the following specific aims will be completed:

Our study provide evidences indicate that cigarette smoking (NO, NO<sub>x</sub>) induce human cancer cells apoptosis. The mechanisms were well characterized in this study. We also demonstrated that some pollutants in enviroment such as copper ion potentiate the apoptotic effects induced by NO. Such results make us to avoid to contact the cigarette smoking and some enviromental factors. To search the naturally occurring compounds that can prevent the toxic effects of Nox. We demonstrated that the antioxidants such L-N-acetyl cysteine can prevent the apoptotic effects induced by NO. The emcahanisms were demonstrated as elevation of the intracellular glutathione. We also investigated the effects of the nicotine involved in cancer cell proliferation. We demonstrate that nicotine promote the lung cancer cells proliferation through activation of some signal transduction pathways such as activation of mitogen activation promoting kinase (MAPKs). We also demonstrate that

nicotine activated cyclin D1, D3 and inhibit the p27 which eventually promote human cancer cells proliferation. The mechanisms was demonstrated in our study and indicate that ERK kinase significant involved in regulation of these genes. We are demonstrated that EGCG (the component of green tea extract) can attenuate the proliferation effects induced by nicotine in human lung cancer cells. The mechanisms must be still investigated in our further experiment. We also demonstrated that the ERK and JNK kinase were significantly elevated in the WBC of the somking individual. This findings provide significant results indicate that the JNK and ERK may be used as a biomarker in the individual expose to smoking.

**Keywords:**Cigarette smoke, biomarkers, antioxidants.

## 二、緣由與目的

### 煙害之流行病學研究

流行病學研究指出吸煙是造成許多慢性疾病如支氣管炎，肺氣腫，肺癌，及心臟血管疾病的主要危險因子(1)。在工業化國家約有 50% 死亡原因為心臟血管疾病，而抽煙已經證實是一重要因素(2)。根據 1989 年 Surgeon General's 報導(3)指出，"1985 年因抽煙造成的肺癌死亡率為 87%，因慢性阻塞性肺臟疾病之死亡率為 82%，因心臟血管疾病所造成的死亡率為 21%，另外包含了 18% 不明病因之猝死”。Peto 等人估計在 1995 年美國約有 558,000 人死因與抽煙有關(4)，並且估計全球每年與抽煙相關之死亡率為兩千一百萬人。有學者估計全美國抽煙人口約五千萬人，因抽煙所引起的疾病醫療費用一年約耗費五百億美金(5)。因此，抽煙所引起的健康醫療問題實在值得深入去探討。

### 香煙燃燒所產生的自由基物質

即使許多流行病學研究均指出抽煙與疾病之相關性，但是抽煙導致

細胞內生化與分子生物學之致病機轉並未完全研究清楚。儘管許多香煙所含致癌化合物已定出其分子結構，並證實其致癌作用機轉，然而越來越多研究證實香煙燃燒所產生的自由基如一氧化氮(nitric oxide, NO), 氮氧化物(nitrogen oxides, NOx)等對組織的傷害與疾病的產生過程其實扮演更為重要的角色(6)。香煙所產生的自由基(NO, NOx)或是活性氧(O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>)已經證實可以活化肺臟巨噬細胞，此一反應造成許多肺臟相關疾病之產生(7-9)。根據 Pryor 和 Stone 等人報導指出(10)，每枝香煙燃燒可以產生大約  $1 \times 10^{15}$  個自由基分子，其中因為抽煙所產生的 NO 濃度在空氣中更是高達 500-1000 ppm，是目前所知人類暴露於 NO 最主要的來源。NO 是目前全世界學者所矚目的一個有趣分子，不僅在生理上它扮演了許多重要角色(如血壓調控，神經傳導等)，當它過度產生更會對細胞產生許多毒性作用(11)。

本計劃希望藉由基礎與臨床應用研究進一步釐清香煙燃燒所產生的 NO, NOx, 與 peroxynitrite 之致病機轉，提供可行之預防方法。

## 三、重要研究成果

### 壹、本計劃完成幾項重要的結果

1. 我們證實香煙中所含 NO 氣體可以誘發人類癌細胞凋亡，其細胞毒性分子機轉已經釐清。
2. 我們證實環境中銅離子污染物會造成 NO 毒性的加成傷害。
3. 我們證實環境中有些抗氧化物質如 L-N-acetyl-cysteine 可以緩解 NO 所造成的傷害，此機轉與提高細胞內抗氧化物質有關。
4. 我們證實肺癌細胞受到 nicotine 刺激後會活化細胞內訊息傳遞蛋白，如 p38, ERK, JNK 等造成肺癌細胞迅速增生。
5. 我們更進一步證實 nicotine 的作用與活

化細胞週期調控蛋白 cyclin D1, D3, p27 有關, 進一步讓我們了解香煙中許多有毒物質可能致癌的機轉。

6. 我們證實綠茶中 EGCG 成分可以緩解 nicotine 的作用。
7. 本計劃根據前述結果進一步證實抽煙個體白血球中 ERK, JNK 蛋白的表現明顯增加。

#### 四、本計劃研究成果在空污防治上的重要貢獻

本計劃除了深入而完整的探討香煙中主要兩種成分 NO, nicotine 的毒性機轉, 也提出環境中可能緩解這些有毒物質的天然物質(如綠茶)。在抽煙個體取得之白血球中我們證實血球細胞中 ERK, JNK 蛋白的表現明顯增加。我們的結果將提供其他研究學者作為人體暴露於香煙後血中的生物指標。

#### 五、未來研究目標

將來我們希望進一步探討抽煙個體在改變飲食(如鼓勵喝茶)或停止抽煙一段期間後其血中生物指標是否改變, 此項結果將更能幫助我們對本計劃研究成果之確認。

#### 六、參考文獻

1. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Smoking, tobacco and cancer program. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 1990. (NIH publication no. 90-3107.)
2. Lakier JB. Smoking and cardiovascular disease. Am J Med 1992;93: 8S-12S.
3. US Department of Health and Human Services (DHHS). Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. A report of the Surgeon General. Rockville, MD: Department of Health and Human Services, 1989. [DHHS publication no. (CDC) 89-8411.]

4. Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. Lancet 1992;339:1268-78.
5. Bartlett JC., Miller LS, Rice DP, Max WB. Medical-care expenditures attributable to cigarette smoking — United States, 1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1994;43:469-72.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? J Lab Clin Med 1992;119: 598-620
7. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect 1985;64: 111-26.
8. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxy radicals and endonuclease activation. Chem Biol Interact 1992;81:197-208
9. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. Ann N Y Acad Sci 1993;686:72-89.
10. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. Ann N Y Acad Sci 1993; 686:12-27.
11. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993;329:2002-12.