

中華民國第 54 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 生活與應用科學科

第三名

040818

悠油的細胞

— 廚房油煙對肺泡 A549 細胞影響的探討

學校名稱：臺北市立中山女子高級中學

作者： 高二 廖婉淳 高二 楊怡歆	指導老師： 鄭琪玟
-------------------------	--------------

關鍵詞：油煙、肺泡細胞、抗氧化能力

# 悠油的細胞-廚房油煙對肺泡 A549 細胞影響的探討

## 摘要

油品在高溫下會產生揮發性物質，吸入可能有害肺臟。本實驗探討油煙生成，及油煙對人類肺泡 A549 細胞生長及細胞內抗氧化能力的影響。

方法是加熱大豆油、橄欖油、葵花油至冒煙點以上，收集油煙。將不同量、不同加熱時間、不同油品之油煙與已知有害物質苯並[a]芘加到 A549 細胞上，測 24 與 72 小時的細胞存活率，及細胞總抗氧化能力和超氧化物歧化酶活性。

結果發現加熱越久，油煙量越多且油的酸價越高。油煙與苯並[a]芘都會影響 A549 細胞存活率及抗氧化能力，且與油煙量相關。當油煙量夠高時(約 $> 600\mu\text{g}$ )，A549 細胞之存活率及抗氧化能力均明顯變差。

結論是油加熱至超過冒煙點會產生油煙，當油煙量高到一個程度，就有可能對肺泡細胞造成傷害並影響到細胞生長及抗氧化能力。

## 壹、研究動機

肺臟是人體很重要的器官，呼吸道疾病一直是大家生病或住院的主要原因之一。而且癌症是目前我國民眾的前十大死因之首，其中肺癌歷年皆列於前 5 名中。我們在呼吸的時候，難免會同時吸入空氣中的懸浮微粒，所以了解環境中可能存在的有害肺臟的因子是值得探討的議題。

據資料顯示，有些罹患肺癌的人並未抽菸，是什麼原因讓這些人罹患癌症呢？我們每天烹調食物都可能會用到油。煎炒炸食物時常會產生油煙，而油品在高溫下裂解產生的揮發性物質存在於油煙中，其中可能有揮發的油脂及其加熱分解後的化學產物，那麼吸入過多的廚房油煙是否可傷害到肺細胞，而與肺部的疾病相關呢？因此引發我們深入探討的興趣。

我們也查到日常生活中人體可能會接觸到各種氧自由基，又稱為活性氧(reactive oxygen species)。過多的活性氧累積在體內可能會導致細胞損傷，影響細胞的抗氧化能力，進而造成身體的疾病，甚至有致癌的可能。人體必須經由抗氧化機制迅速有效地將過多的活性氧排除。我們想吸入廚房油煙是否可能影響到肺泡細胞的生長以及抗氧化能力，進而造成肺臟的病變呢？所以我們設計本實驗來一探究竟。

但是，如果想要直接研究廚房油煙對人體肺臟的影響需要長期的人體研究與觀察。我們必須設計實驗室可以執行的實驗來看廚房油煙對肺泡細胞的短期影響。所以我們想到利用實驗室常用來研究肺泡細胞的 A549 細胞株，來觀察廚房油煙對人體肺泡細胞的短期影響。

此外在高一基礎化學第四單元中的氧化還原反應的課程中，我們曾學過氧化還原反應的原理，因此想藉由簡易的氧化還原反應實驗，來測定肺泡細胞在接觸廚房油煙萃取物後的細胞存活率與抗氧化能力變化。

我們的假設是廚房油煙的產生受到油品種類及加熱時間等因素的影響，且油煙中可能含有一些有害肺細胞的化學物質，這些化學物質可能會直接影響到肺細胞的存活與生長，也可能影響到細胞內的抗氧化能力而使活細胞更易致病。

## 貳、 研究目的

- 一、探討不同的烹調時間和不同種類的油品對油煙生成的影響。
- 二、探討不同量的已知油煙中有害物質苯並[a]芘對肺泡 A549 細胞的生長與細胞內抗氧化能力的影響。
- 三、探討不同量、不同的烹調時間和不同種類油品的油煙萃取物對肺泡 A549 細胞的生長與細胞內抗氧化能力的影響。

## 參、 研究設備及器材

### 一、主要器材、試劑與油品

- (一) 三種烹調用油：大豆油、橄欖油、葵花油。
- (二) 苯並[a]芘 (Benzo[a]pyrene, C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>, 簡寫 BaP) 標準品
- (三) 肺泡 A549 細胞株
- (四) 細胞培養用試劑：細胞緩衝液 (PBS)、F-12K 細胞培養液、胎牛血清(FBS)、Trypsin-EDTA
- (五) 抗氧化能力測定試劑:
  - 1.總抗氧化能力測定試劑套組  
[OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit]
  - 2.超氧化物歧化酶活性試劑套組  
[Superoxide dismutase (SOD)Activity Assay Kit]
- (六) 重要試劑:
  - 1.MTT 細胞存活率分析試劑:  
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
  - 2.其他試劑：二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、NP-40 細胞膜溶解劑(nonyl phenoxypolyethoxylethanol)、丙酮(Acetone)
- (七) 低溫高速離心機
- (八) 細胞培養箱(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- (九) 生物安全櫃
- (十) 恆溫水浴槽
- (十一) 4°C 冰箱、-80°C 冷凍冰箱
- (十二) 一般顯微鏡、倒立顯微鏡
- (十三) 全波長式多功能分析儀(Infinte M200PRO, ELISA Microplate Reader, TECON Group Ltd., Männedorf, Switzerland)
- (十四) 酸價試紙

### 二、次要器材

- (一) 加熱電磁攪拌器



BaP 標準品



TAC 試劑組



SOD 試劑組



生物安全櫃



全波長式多功能分析儀



酸價試紙

- (二) 加熱氮氣旋轉蒸發器
- (三) 電動吸管輔助器
- (四) Whatman no. 2 濾紙
- (五) 微量塑膠管(eppendorf tube)與試管架
- (六) 300°C 高溫溫度計
- (七) 250 cc 透明血清瓶
- (八) 96 孔平底塑膠盤(96-well plate)
- (九) 6 孔平底細胞培養盤(6-well plate)
- (十) 微量塑膠離心管 eppendorph (1mL, 2 mL)
- (十一) 微量分注器 (pipetman 1000μL, 200μL, 20μL, 10μL)
- (十二) 磁鐵、鋁箔紙
- (十三) 細胞培養瓶(flask)
- (十四) 液態氮桶、液態氮
- (十五) 細胞計數玻片、計數器
- (十六) 細胞冷凍管

## 肆、研究過程或方法

### 一、事前準備與前置實驗

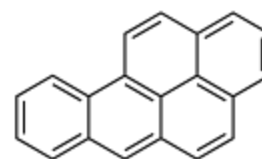
#### (一) 購買油品與研究用化學藥品

1. 購買三種常用的廚房烹調用油:  
大豆油、橄欖油、葵花油。



大豆油      橄欖油      葵花油

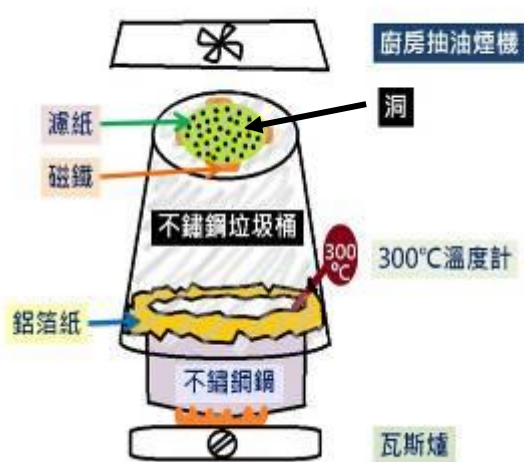
2. 購買苯並[a]芘(Benzo[a]pyrene, C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>, 簡寫 BaP)標準品。  
這是已知的油煙中的有害致癌物質，屬於多環芳香烴化合物之一。它是油煙相關實驗的文獻中最早被提出、最具毒性、常被研究的致癌物質。另外，它是少數可購買到的多環芳香烴化合物。因此我們以此做為實驗相關步驟之油煙有毒成分參考用標準品。



BaP 結構式

#### (二) 設計油煙收集器

1. 將不鏽鋼桶的桶底打小洞(密)，成半徑為 9cm 的圓。使用時反轉過來，使打洞處在上方。
2. 桶壁上打一小洞以插入溫度計，使其可深入油內。
3. 將濾紙 2 張(事先秤重)以小磁鐵固定於打洞的圓形區域。
4. 用透明塑膠紙與鋁箔紙圍在瓦斯爐四周，使抽油煙機抽吸功能達最佳狀態，讓油煙可以持續向上吸附在濾紙上。
5. 將鋁箔紙環繞不鏽鋼鍋邊緣。油加熱至冒煙後，蓋上不鏽鋼桶，卡鋁箔紙上，約每 10 分鐘調整瓦斯爐火力以保持油溫穩定。



裝置示意圖



實際裝置

### (三) 油冒煙點測試

1.取 300mL 的油倒入鍋中，插入高溫溫度計，看到冒出明顯的灰煙時記錄溫度為冒煙點。得到的冒煙點如下：

- (1)大豆沙拉油：250°C
- (2)純橄欖油: 220-230°C
- (3)葵花油：220-230°C

### (四) 油煙收集

- 1.新鮮油 1000mL 放鋼鍋內加熱到冒煙，罩上桶狀上蓋如上述裝置。盡量使溫度穩定，維持冒煙點  $\pm 20^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.持續加熱至預定時間，並隨時查看溫度、調整火力。時間到後關掉火源，將不鏽鋼桶取下並翻轉過來，蓋上鍋蓋，冷卻約 5-10 分鐘後取下鍋蓋。
- 3.移除磁鐵，取下濾紙擦拭不鏽鋼垃圾桶壁。
- 4.將濾紙撕成小塊，放入預先秤過重的塑膠罐。
- 5.測剩油酸價，並收集一小罐儲存。
- 6.油的加熱時間:
  - (1)大豆油：1(連續 1 小時)、2(連續 2 小時)、3(連續 3 小時)、6(第 4-6 小時)、9(第 7-9 小時)小時。
  - (2)橄欖油、葵花油：3 小時(連續 3 小時)。
- 7.其他油煙：為另外在抽油煙機的油杯中收集到的油煙，包括加熱大豆油、橄欖油與葵花油過程的產物。

### (五) 萃取油煙

- 1.將前述取得之含油煙濾紙放入 250 mL 丙酮中置放 2 小時以上，使油煙充分溶出。
- 2.移除濾紙。將丙酮溶液用乾淨的濾紙過濾。

- 3.油煙過濾液，用加熱磁石震盪器蒸發至 10mL 以下(設熱度 3~5，轉速 2)，液溫不超過 58°C。
- 4.將剩餘溶液倒入預先稱重的玻璃試管中，放入 vacuum rotating evaporator(氮氣旋轉蒸發器)蒸乾(40°C、rotator 5、約 2~3hr)。
- 5.秤重算出固體物淨重。
- 6.將油煙固體物溶於溶劑 DMSO 中，配成濃度 200mg 油煙/mL DMSO。最後分裝於 2mL eppendorph 中，置於 4°C 冰箱備用。



油煙萃取過程圖

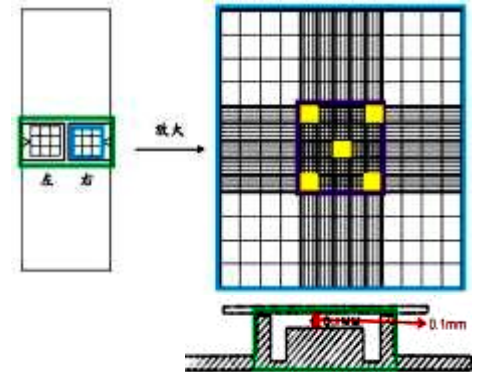
#### (六) 肺泡 A549 細胞培養 (未特別註明之培養基皆為 F12K/10% FBS 培養基)

- 1.細胞株:使用肺腺癌細胞之細胞株 A549，這種細胞保有肺泡上皮細胞之各種特性，常被用來做肺細胞研究的動物體外研究。
- 2.細胞培養的基本程序:
  - (1).解凍細胞株
    - 1).準備乾淨的細胞培養瓶(flasks)。
    - 2).加入 8~9mL 的培養基
    - 3).從液態氮保存桶中取出冷凍保存的細胞株，放到 37°C 水浴槽中快速解凍。
    - 4).取 1mL 培養基加入冷凍管中混合均勻。
    - 5).將培養基連同解凍的細胞株液抽出，置入細胞培養瓶中，放入培養箱中培養。
    - 6).隔天換新鮮培養基。
  - (2)日常培養與觀察
    - 1).顯微鏡觀察生長狀況，每隔 2~3 天，吸除一半的培養基，加入等量的新鮮培養基。
    - 2).細胞長到約 80% ~ 90% 時，進行分盤。
  - (3)細胞分盤培養
    - 1).完全吸除舊的培養基。
    - 2).用 PBS 沖洗培養面兩次。
    - 3).加入適量的 1X Trypsin-EDTA，靜置約 3 分鐘後，放置於倒立顯微鏡底下觀察細胞狀態，如細胞已呈現圓形的懸浮狀態，就可加入適量培養基，終止 Trypsin-EDTA 的作用
    - 4).用 pipet 將吸附的細胞沖洗下來 (勿產生氣泡)，移到 15mL 無菌離心管中。
    - 5). 300xg 21°C 離心 5 分鐘。
    - 6).移除上清液，手指將沉積在離心管底部的細胞打散
    - 7).加入適量培養基，混合均勻，放入已事先加入培養基的 flasks 中
    - 8).顯微鏡觀察細胞狀態後，迅速放入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，進行培養。

#### (4)細胞計數：

- 1).取 100  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液與 100 $\mu\text{L}$  Turk 染色液混合均勻。
- 2).取少許混合液 (約 15 $\mu\text{L}$ ) 自血球計數盤上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍顯微鏡下觀察染為藍紫色之細胞。
- 3).細胞計數盤：

有二個網格(如右圖)，每個網格中細刻 9 個 1  $\text{mm}^2$  之大正方形，其中位於中央的再細刻成 25 個小格，當蓋上專用蓋玻片後，蓋玻片與 chamber 底面的高度為 0.1  $\text{mm}$ ，所以每個大正方形之體積為  $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mL}$ 。分別計數 2 chambers 的 5 個小方格之細胞總數 $\rightarrow \times 5 \div 2 \times 2 \times 10^4$ ，即為每 1 $\text{mL}$  中細胞懸浮液之細胞數。



細胞計數盤網格放大圖

#### (5)分入 6 孔細胞培養盤:

- 1).同細胞分盤培養至步驟 7。
- 2).吸取少量的溶液，進行數細胞。
- 3).配成  $1 \times 10^6 / 2\text{mL}$  的 F-12K(含 1%FBS)溶液。
- 4).取 6 孔細胞培養盤，每孔加入 2  $\text{mL}$  的細胞溶液。
- 5).放入培養箱中，過夜使細胞貼壁後加藥(油煙或 BaP)做實驗。



A549 細胞培養



細胞培養瓶



恆溫水浴槽中加熱



6 孔細胞培養盤

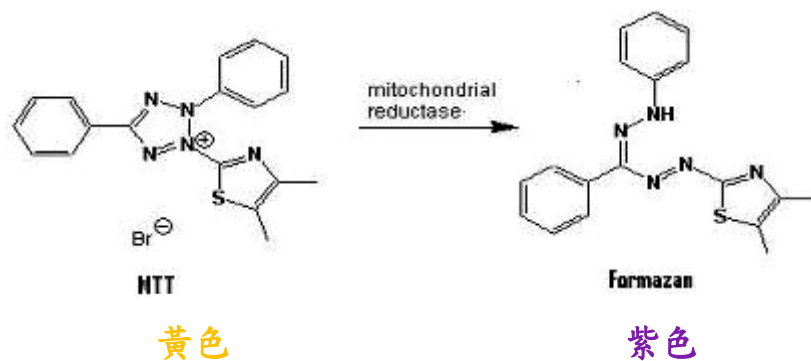
## 二、實驗一：BaP 對 A549 細胞之影響

### (一) BaP 對 A549 細胞 24 小時的直接毒性:

- 1.在 6 孔 A549 細胞培養盤中(每 well 約有  $1 \times 10^6$  個細胞)，加入含有 1%FBS 的 F12K 培養液。置於細胞培養箱中，隔夜使其貼壁。
- 2.分別加入 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g}$  BaP，放置細胞培養箱中 24h。每一劑量都要重複 3 次。
- 3.24hr 後測細胞存活率(MTT test)。
4. MTT test(細胞存活率測定)原理：

MTT [3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]為黃色化合物，是一種可接受氫離子的染料，可作用於活細胞粒線體中的呼吸鏈，在粒線體還原酶的作用下四氫唑環(tetrazolium)會開裂，生成紫色的甲臍(formazan)結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中的還原酶會消失，不能將 MTT 還原）。Formazan 可溶於 DMSO。可利用測吸光值(570nm)得知細胞還原 MTT 的能力(甲臍的形成量)，此吸光值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故此試驗可用作細胞存活率的指標。

## MTT test 反應圖



### 步驟：

- (1)吸除每孔中液體，以 PBS 沖洗 2 次(速度慢，沿壁沖洗並輕搖)。
- (2)加入 MTT：0.5mg/ mL (用 F-12K 稀釋)，2 mL/well。
- (3)放入細胞培養箱中 5 小時。
- (4)取出 6-well 盤並吸除上液，用 PBS 沖洗 2 次。
- (5)加入 DMSO 1mL/well，放入 ELISA reader 中避光與搖晃 3 分鐘，測 570nm 吸光值。

### (二) BaP 對 A549 細胞 72 小時生長的影響

- 1.在 6-well 細胞培養盤中(每 well 約有  $1 \times 10^6$  個細胞)，加入含有 1%FBS 的 F12K 培養液。置於細胞培養箱中，隔夜使其貼壁。
- 2.取出培養盤，吸除原培養液。更換為含有 10%FBS 的 F12K 培養液。
- 3.第一排的 3 wells 不加 BaP，做為控制組。其餘 wells 中分別加入 10, 20, 50, 100, 200 $\mu$ g 的 BaP，置於細胞培養箱中培養，每一種劑量都要重複 3 次。
- 3.72hr 後做 MTT test。

## 三、實驗二：油煙對 A549 細胞之影響

### (一) 比較不同量的大豆油油煙(cooking oil fume,簡寫 COF)量對 A549 細胞 24 與 72 小時的影響

- 1.在 6-well 細胞培養盤中(每 well 約有  $1 \times 10^6$  個細胞)，加入含有 1%FBS 的 F12K 培養液。置於細胞培養箱中，隔夜使其貼壁。
- 2.第一排的 3 wells 不加油煙，做為控制組。其餘每個 well 中分別加入 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 $\mu$ g 的大豆油 3h 油煙(COF)量，置於細胞培養箱中培養，每一種劑量都要重複 3 次。
- 3.24hr(持續用含有 1%FBS 的 F12K 培養液)與 72 hr(更換為含有 10%FBS 的 F12K 培養液)後做 MTT test。

### (二) 比較加熱不同時間的大豆油油煙對 A549 細胞 24 與 72 小時的影響

- 1.在 6-well 細胞培養盤中(每 well 約有  $1 \times 10^6$  個細胞)，加入含有 1%FBS 的 F12K 培養液。置於細胞培養箱中，隔夜使其貼壁。
- 2.第一排的 3 wells 不加油煙，做為對照組。其餘每個 well 中分別加入 100, 1000 $\mu$ g 的



加熱不同時間的油煙(COF)量，置於細胞培養箱中培養，每一種劑量都要重複 3 次  
3. 24hr(持續用含有 1%FBS 的 F12K 培養液)與 72 hr(更換為含有 10%FBS 的 F12K 培養液)後做 MTT test。

### (三) 比較不同油的油煙(COF)對 A549 細胞 24 與 72 小時的影響

- 1.在 6-well 細胞培養盤中(每 well 約有  $1 \times 10^6$  個細胞)，加入含有 1%FBS 的 F12K 培養液。置於細胞培養箱中，隔夜使其貼壁。
- 2.第一排的 3 wells 不加油煙，做為控制組。其餘每個 well 中分別加入 100 $\mu$ g 或 1000 $\mu$ g 的三種不同油煙(COF)量，置於細胞培養箱中培養，每一種劑量都要重複 3 次。
- 3.另將直接在廚房抽油煙機的油杯中收集到的“其他油煙”，以同樣方法做實驗。
- 4.24hr(持續用含有 1%FBS 的 F12K 培養液)與 72 hr(更換為含有 10%FBS 的 F12K 培養液)後做 MTT test。

## 四、實驗三：BaP 與油煙對 A549 細胞抗氧化能力之影響

### (一) 收集細胞上清液：

- 1.在 6-well 細胞培養盤中(每 well 約有  $1 \times 10^6$  個細胞)，加入含有 1%FBS 的 F12K 培養液。置於細胞培養箱中，隔夜使其貼壁。
- 2.第一排的 3 wells 不加油煙，做為控制組。其餘每個 well 中分別加入不同量的 BaP 或各種不同油煙的油煙(COF)量，如同實驗一與實驗二的 24hr 實驗步驟，置於細胞培養箱中培養，每一種劑量都要重複 3 次。
3. 24hr 後，使用 NP40 溶解細胞膜，打碎細胞。步驟如下：
  - (1)將培養皿裡的舊培養基完全吸除掉，用冰涼的 PBS 沖洗兩次，將沖洗過後的培養皿放置在冰上。
  - (2)加入已經先放置在冰箱內預冷的 NP40 細胞溶解緩衝液，每孔含  $1 \times 10^6$  細胞量用 0.4 mL NP40。
  - (3)冰浴 30 分鐘，冰浴期間每隔 3~5 分鐘搖晃培養皿使 NP40 能覆蓋細胞面。
  - (4)在冰上將培養皿傾斜，用吸管吸出培養皿裡面的所有溶解物，移到適合的離心管中。
4. 離心(20,000xg, 4°C 離心 10 min)後，收集上清液分裝於 eppendorph 中，置於 -80°C 冰箱備用。

### (二) 測定細胞上清液之抗氧化能力：

#### 1.總抗氧化能力(Total Antioxidant Capacity, TAC)測定：

採用之 TAC 試劑為 OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (STA-360, Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)。

**試劑原理：**抗氧化劑可將  $\text{Cu}^{2+}$  還原為  $\text{Cu}^+$ 。還原後， $\text{Cu}^+$  可和顯色劑反應呈現橙色，而在 490nm 下有最大吸光值。吸光值與總還原能力成正比。吸光值越高(顏色越深)代表銅離子還原量越高，也代表細胞總抗氧化能力越高。



TAC 橙色反應



測定步驟：

- (1) 配製維生素 C 標準溶液 (維生素 C 之已知濃度溶液的總抗氧化能力(TAC))：  
以微量天平秤取 17.6mg 維生素 C ( $C_6H_8O_6$ , 分子量 176)，加入 10mL 去離子蒸餾水溶解得 10mM 溶液，再將其中 1mL(10mM)與 4mL 去離子蒸餾水混合均勻，得標準樣品液(2mM)。再依下表比例配出 0-1000  $\mu$ M 之標準溶液。

表 1. 不同濃度的維生素 C 標準溶液配製法

編號	2mM 維生素 C 標準溶液 ( $\mu$ L)	去離子蒸餾水量 ( $\mu$ L)	維生素 C 濃度 ( $\mu$ M)
#1	500	500	1000
#2	#1 的 500	500	500
#3	#2 的 500	500	250
#4	#3 的 500	500	125
#5	#4 的 500	500	62.5
#6	#5 的 500	500	31.25
#7	#6 的 500	500	15.625
#8	0	500	0.0

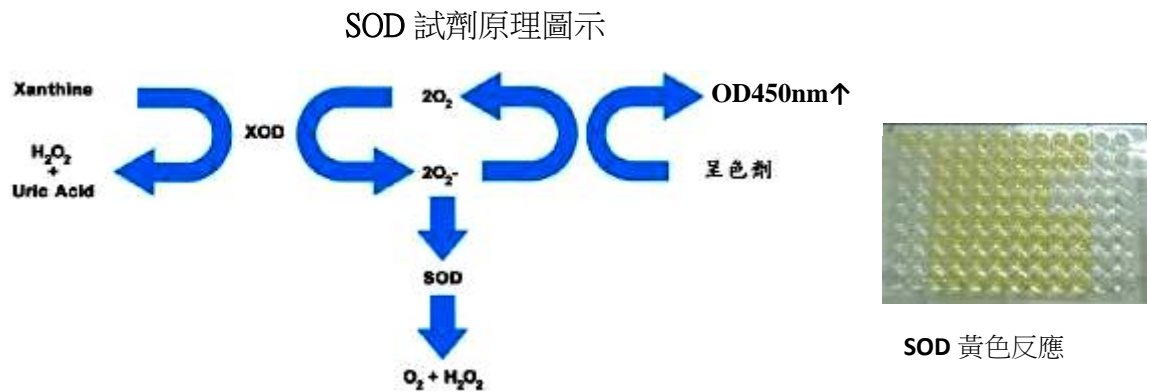
- (2) 維生素 C 標準品與實驗樣品之 TAC 吸光值測定步驟：

- 1).所有待測之維生素 C 標準品與樣品以微量分注器吸取 40 $\mu$ L 樣品於 96 孔平底塑膠盤中。
- 2).每一小孔加入 180 $\mu$ L 的反應緩衝液。混合均勻。
- 3).將光譜分析儀設定於 490 nm 波長。
- 4).每一小孔加入銅離子試劑 50 $\mu$ L。
- 5).置放於光譜分析儀內執行軌道式搖動 5 分鐘。
- 6).每一小孔加入 50 $\mu$ L 的反應終止液。再測定於 490nm 波長之吸光值。
- 7).算出維生素 C 標準品濃度與吸光值線性方程式。
- 8).將所得的樣品吸光值代入由維生素 C 標準品濃度與其吸光值求得之線性方程式，以算出相當於多少濃度維生素 C 標準品所能達到的銅離子還原量(抗氧化能力)。
- 9).算出每一樣品(實驗組)與當次控制組相除之百分比。

## 2.超氧化物歧化酶(Sodium Superoxide Dismutase, 簡寫 SOD)活性測定：

使用超氧化物歧化酶活性分析試劑組(Superoxide Dismutase Activity Assay Kit, BioVision Catalog #K335-100, Milpitas, USA)做 SOD 活性測定實驗。用 SOD 活性來看細胞內的抗氧化酵素是否受影響。

**試劑原理：**超氧化物歧化酶 (Sodium Superoxide Dismutase, 簡寫 SOD) 是細胞內最重要的抗氧化酵素之一。它能催化超氧陰離子( $O_2^-$ )的歧化作用，使其變成過氧化氫( $H_2O_2$ )和氧分子( $O_2$ )。這個 SOD 檢測試劑組是利用其所附的反應溶液 (WST 溶液)，它能與超氧陰離子作用而呈現黃色。這種超氧陰離子生成的速率與黃嘌呤氧化酶 (Xanthine oxidase, XO) 的活性呈線性相關，而細胞中的超氧化物歧化酶活性越高，超氧陰離子濃度則越低，與呈色劑反應產生的黃色產物會越少，因此吸光值會越低。



**測定步驟：**

- (1) 使用 96 孔盤，每孔中分別加入 20 $\mu$ L 樣品或去離子蒸餾水 20 $\mu$ L(空白格)。
- (2) 每 well 中加入分析試劑組的 WST 溶液 200 $\mu$ L。
- (3) 每 well 中加入分析試劑組的酵素溶液 20 $\mu$ L。
- (4) 置於 37 $^{\circ}$ C 中 20 min。
- (5) 測定 450nm 之吸光值，帶入下面公式換算 SOD 活性。

$$\text{SOD 活性(抑制百分率)} = (\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{樣品}}) / (\text{OD}_{\text{空白}})$$

## 伍、研究結果

### 一、前置實驗

(一) 三種油測得之冒煙點如下：

1. 大豆沙拉油：250 $^{\circ}$ C
2. 純橄欖油：220-230 $^{\circ}$ C
3. 葵花油：220-230 $^{\circ}$ C

### (二) 油煙收集量與油的酸價測定結果

表 2. 大豆油在加熱不同時間後產生的油煙量與油的酸價

加熱時間(小時)	加熱溫度( $^{\circ}$ C)	油煙淨重(g)	油的酸價
1	250 $\pm$ 20	0.4083	1.5
1-2	250 $\pm$ 20	0.6557	1.5
1-3	250 $\pm$ 20	1.6474	2.0
4-6	250 $\pm$ 20	3.8867	2.5
7-9	250 $\pm$ 20	4.2765	4.0

由此可看出大豆油加熱時間越久後，油煙產生量越多，且油質劣化程度(酸價變高)越嚴重。

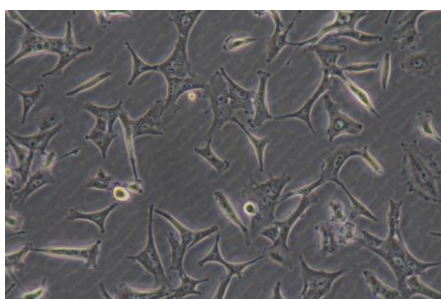
表 3.各種油在加熱後產生的油煙量與油的酸價

三種油	加熱溫度(°C)	油煙淨重(g)	油的酸價
大豆油 3h	250 ± 20	1.6474	2.0
橄欖油 3h	225 ± 20	2.6963	2.0
葵花油 3h	225 ± 20	1.7133	3.5

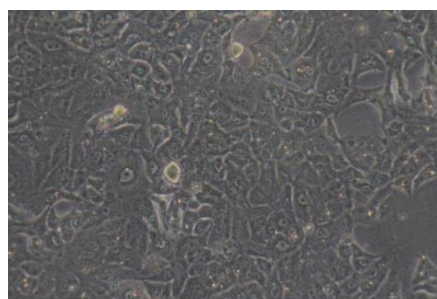
由此表比較同樣加熱 3 小時的大豆油、橄欖油與葵花油，發現橄欖油產生的油煙量最多，但是油質劣化程度比較則以加熱後的葵花油的酸價最高。

### (三)A549 細胞培養與觀察

**細胞外觀:** A549 為貼壁型細胞，在含 10%FBS 之 F12K 培養液下細胞生長情形很好。顯微鏡下觀察發現細胞貼於培養瓶底上，呈現多角形樣貌。在足夠的營養與適合的環境下培養 72 小時後細胞增生快速，會長滿培養瓶底且擠在一起。



分盤後 24 小時外觀



培養 72 小時後外觀(已長滿)

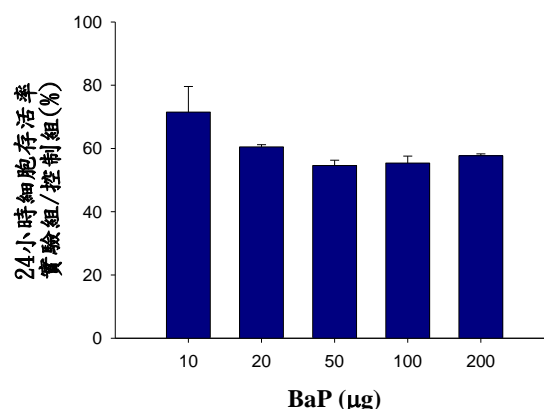
## 二、實驗一：BaP 對 A549 細胞之影響

數據呈現為“實驗組/控制組”之百分比。所有數值皆為做三次重複之平均值±標準差。控制組為當次未加 BaP 或油煙(COF)之相同培養狀況細胞。

### (一) BaP 對 A549 細胞 24 小時的直接毒性

表 4. A549 細胞加 BaP 24 小時後的細胞存活率

BaP 量 (µg)	細胞存活率
10	71.5 ± 8.1%
20	60.5 ± 0.7%
50	54.6 ± 1.7%
100	55.4 ± 2.2%
200	57.7 ± 0.6%

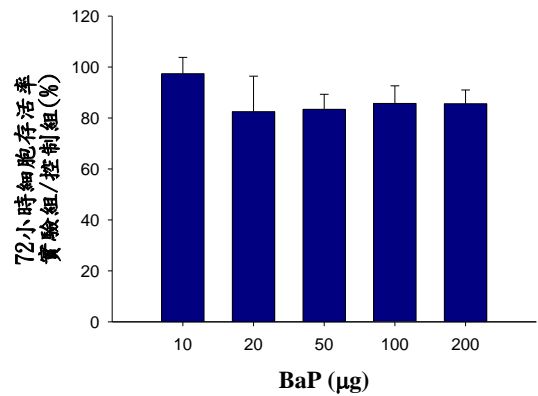


實驗結果顯示 BaP 會對 A549 細胞產生毒性，造成部分細胞死亡。且 BaP 的量增加時，24 小時細胞存活率會下降，在 BaP 量為 20-200µg 時，細胞存活率約為 50-60%。

## (二)BaP 對 A549 細胞 72 小時生長的影響

表 5. A549 細胞加 BaP 72 小時之後的細胞存活率

BaP 量 (μg)	細胞存活率
10	97.4 ± 6.4%
20	78.8 ± 14.4%
50	79.3 ± 2.5%
100	80.0 ± 3.8%
200	84.7 ± 6.6%



實驗結果顯示 BaP 會對 A549 細胞的 72 小時生長造成輕微影響。BaP 量自 10μg 增加至 200μg 時，72 小時的細胞存活率只從 97% 降至約 80%，因此微量的 BaP 對 A549 細胞生長只有輕微的影響。

## 三、實驗二：油煙對 A549 細胞生長之影響

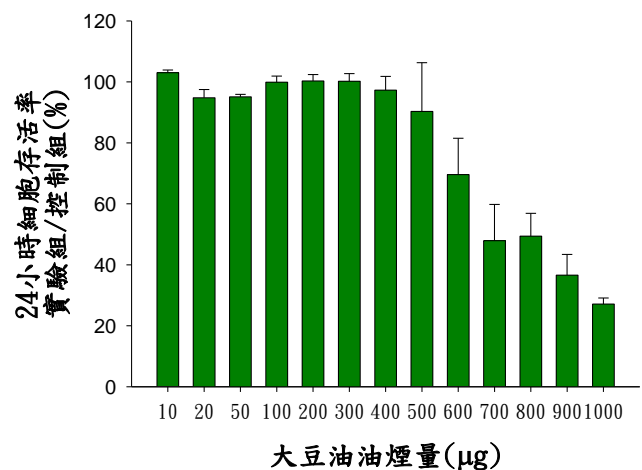
數據呈現為“實驗組/控制組”之百分比。所有數值皆為做三次重複之平均值±標準差。控制組為當次未加 BaP 或油煙(COF)之相同培養狀況細胞。

### (一)不同量的大豆油油煙(COF)對 A549 細胞的影響

#### 1. 24 小時的直接毒性

表 6. A549 細胞加了不同量的大豆油油煙(COF) 24 小時之後的細胞存活率

COF 量 (μg)	細胞存活率
10	103.0 ± 0.9%
20	94.8 ± 2.7%
50	95.1 ± 0.8%
100	99.9 ± 2.0%
200	100.3 ± 2.1%
300	100.2 ± 2.5%
400	97.3 ± 4.5%
500	90.3 ± 16.0%
600	69.6 ± 11.9%
700	47.9 ± 11.9%
800	49.4 ± 7.5%
900	36.6 ± 6.8%
1000	27.1 ± 2.0%

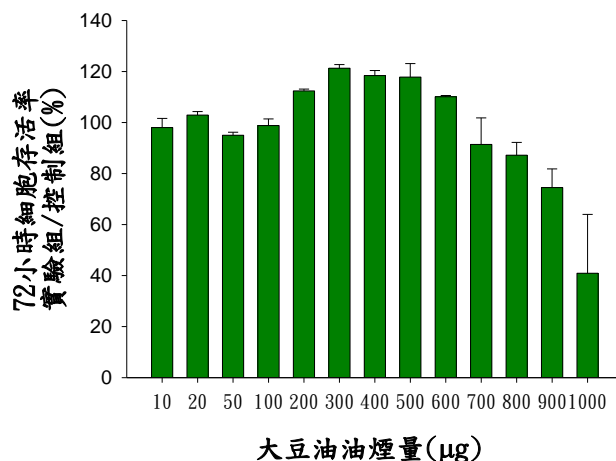


實驗結果顯示大豆油 COF 量自 10μg 增加至 400μg 時，24 小時的細胞存活率都與控制組接近。當量到達 500-1000μg 時，細胞存活率明顯依 COF 量的增加而下降。當 COF 加到 1000μg 時，細胞存活率降至只有約 27%。

## 2. 72 小時生長的影響

表 7. A549 細胞加了不同量的大豆油油煙 (COF) 72 小時之後的細胞存活率

COF 量 ( $\mu\text{g}$ )	72h 細胞存活率
10	$98.2 \pm 3.6\%$
20	$102.9 \pm 1.4\%$
50	$95.1 \pm 0.8\%$
100	$98.7 \pm 2.1\%$
200	$112.4 \pm 0.7\%$
300	$121.3 \pm 1.4\%$
400	$118.4 \pm 2.0\%$
500	$117.8 \pm 5.3\%$
600	$110.1 \pm 0.5\%$
700	$91.4 \pm 10.4\%$
800	$87.2 \pm 5.0\%$
900	$78.5 \pm 0.2\%$
1000	$40.9 \pm 23.1\%$



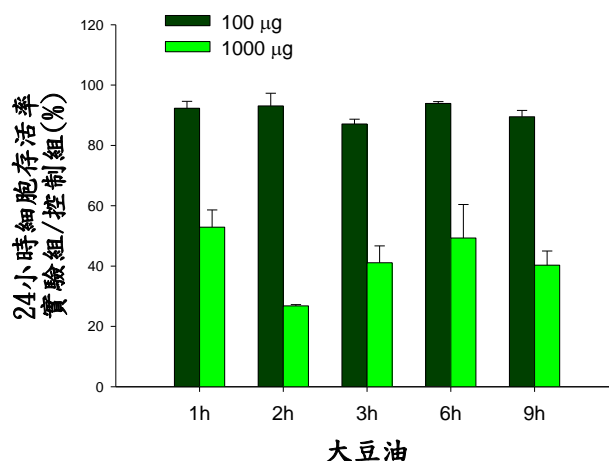
實驗結果顯示大豆油 COF 量自  $10\mu\text{g}$  增加至  $100\mu\text{g}$  時,細胞存活率沒有明顯變化,皆與控制組差不多。當大豆油 COF 量自  $200\mu\text{g}$  增加至  $600\mu\text{g}$  時,細胞存活率高於  $100\%$ 。當大豆油 COF 量自  $700\mu\text{g}$  增加至  $1000\mu\text{g}$  時,細胞存活率明顯依 COF 量的增加而下降。當 COF 加到  $1000\mu\text{g}$  時,細胞存活率降至約  $40\%$ 。

## (二)加熱不同時間的大豆油油煙對 A549 細胞 24 與 72 小時的影響

### 1. 24 小時的直接毒性

表 8. A549 細胞加了不同時間的大豆油油煙 (COF) 24 小時之後的細胞存活率

加熱時間 (小時)	COF $100\mu\text{g}$	COF $1000\mu\text{g}$
1	$92.3 \pm 2.3\%$	$52.9 \pm 5.7\%$
1-2	$93.1 \pm 4.2\%$	$26.8 \pm 0.4\%$
1-3	$87.1 \pm 1.6\%$	$41.1 \pm 5.6\%$
4-6	$93.9 \pm 0.6\%$	$49.3 \pm 11.1\%$
7-9	$89.5 \pm 2.1\%$	$40.3 \pm 4.7\%$

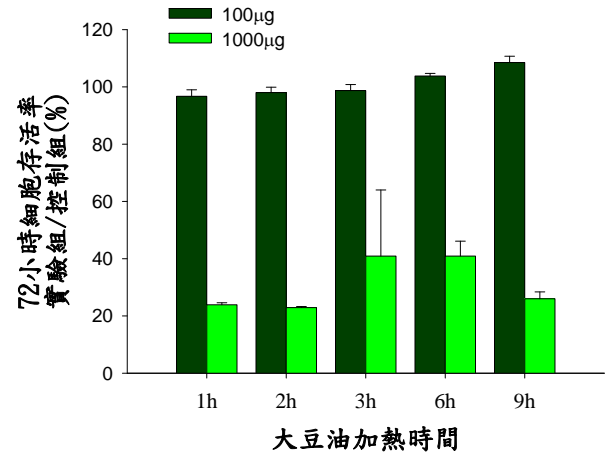


實驗結果顯示大豆油 COF 量為 100 $\mu$ g 時，24 小時的細胞存活率都很高(約 90%)，加熱不同時間的 COF 並無明顯不同。當 COF 量為 1000 $\mu$ g 時，各時間點之細胞存活率均明顯下降，各時間點之細胞存活率為 30-50%，但是細胞存活率與加熱時間並沒有明顯的相關性。

## 2. 72 小時生長的影響

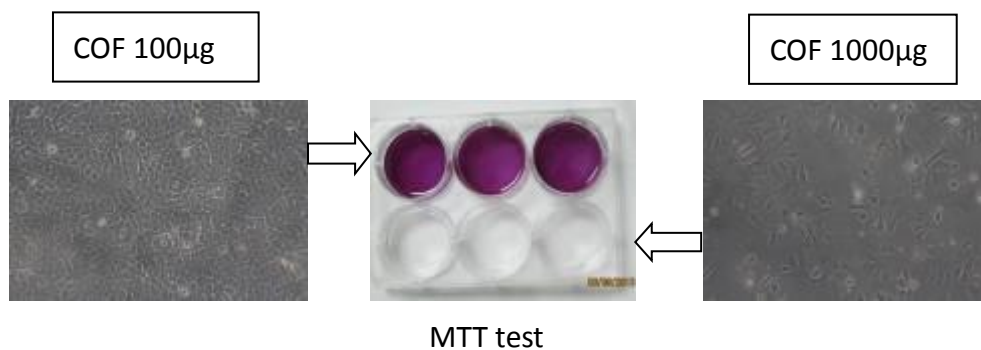
表 9. A549 細胞加了不同時間的大豆油油煙 (COF) 72 小時之後的細胞存活率

加熱時間 (小時)	COF 100 $\mu$ g	COF 1000 $\mu$ g
1	96.7 $\pm$ 2.3%	23.9 $\pm$ 0.7%
1-2	98.0 $\pm$ 1.9%	22.9 $\pm$ 0.4%
1-3	98.7 $\pm$ 2.1%	40.9 $\pm$ 23.1%
4-6	101.6 $\pm$ 1.4%	47.9 $\pm$ 11.9%
7-9	108.5 $\pm$ 2.2%	26.0 $\pm$ 2.4%



實驗結果顯示大豆油 COF 量為 100 $\mu$ g 時，72 小時的細胞存活率都很高(皆接近 100%)，加熱不同時間並未造成 72 小時生長的不同。當 COF 量為 1000 $\mu$ g 時，各時間點之細胞存活率均明顯下降至控制組的 20-40%，細胞 72 小時存活率與加熱時間並沒有明顯的相關性。

下圖是加入 100 與 1000 $\mu$ g 的大豆油 7-9h COF 於 A549 細胞 72 小時後的細胞外觀與 MTT test 之呈色。由圖可看出加入 100 $\mu$ g COF 的細胞生長情形很好，MTT test 結果呈現明顯的紫色，加入 1000 $\mu$ g COF 的細胞生長情形很差，MTT test 結果顏色很淡。

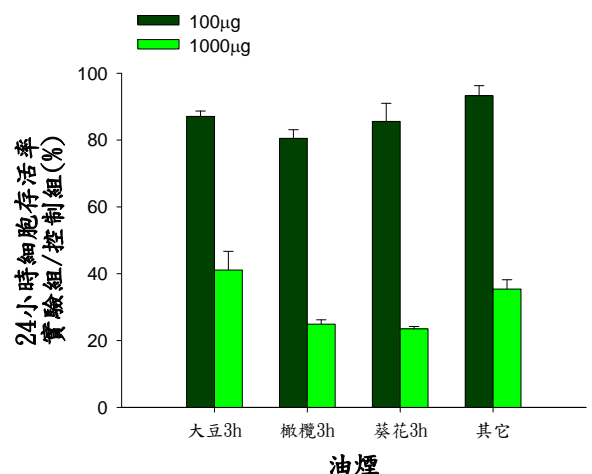


## (三)不同油的油煙(COF)對 A549 細胞的影響

### 1. 24 小時的直接毒性

表 10. A549 細胞加了不同油的油煙(COF) 24 小時之後的細胞存活率

油煙的種類	COF 100 $\mu$ g	COF 1000 $\mu$ g
大豆油油煙	87.1 $\pm$ 1.6%	41.1 $\pm$ 5.6%
橄欖油油煙	80.5 $\pm$ 2.6%	24.9 $\pm$ 1.3%
葵花油油煙	85.6 $\pm$ 5.4%	23.5 $\pm$ 0.7%
其他油煙	93.3 $\pm$ 3.0%	35.4 $\pm$ 2.8%

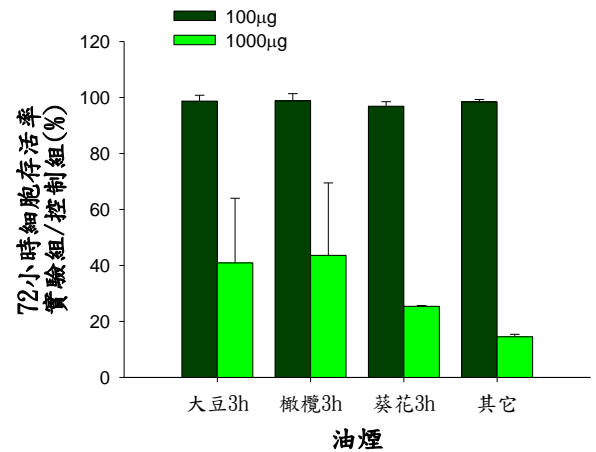


實驗結果四種油煙在添加量為 100 $\mu\text{g}$  時，24 小時的細胞存活率都很高(皆接近 80-90%)。當 COF 量為 1000 $\mu\text{g}$  時，四種油煙之細胞存活率均明顯下降至控制組的 20-40%，其中橄欖油與葵花油的存活率均低於大豆油與其他油煙。

## 2. 72 小時生長的影響

表 11. A549 細胞加了不同油煙(COF) 72 小時之後的細胞存活率

油煙的種類	COF 100 $\mu\text{g}$	COF 1000 $\mu\text{g}$
大豆油油煙	98.7 $\pm$ 2.1%	40.9 $\pm$ 23.1%
橄欖油油煙	98.8 $\pm$ 2.6%	43.6 $\pm$ 25.9%
葵花油油煙	96.8 $\pm$ 1.6%	25.4 $\pm$ 0.3%
其他油煙	98.4 $\pm$ 0.9%	14.5 $\pm$ 0.9%



實驗結果顯示加入不同油的 COF100 $\mu\text{g}$  72 小時後，細胞存活率與控制組相近(約 100%)；當加入量為 1000 $\mu\text{g}$  時，經過 72 小時後，細胞存活率皆明顯下降至控制組的 15-40%，其中葵花油的細胞存活率低於大豆油與橄欖油，其他油煙的細胞存活率最低。

## 四、實驗三：BaP 與油煙對 A549 細胞抗氧化能力之影響

### (一)總抗氧化能力(TAC) 測定結果

#### 1. 維生素 C 標準品之 TAC 測定結果

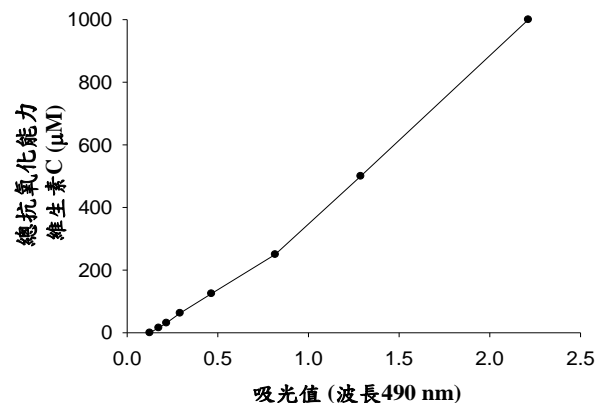
不同濃度的已知抗氧化物維生素 C 與其銅離子還原後的吸光值的相關曲線如右圖。可以看出維生素 C 的濃度與吸光值成良好的線性正相關：

換算出的線性迴歸方程式如下：

維生素 C ( $\mu\text{M}$ ) = -83.478 + 474.462 x 吸光值

$$r^2 = 0.993, p < 0.001$$

以下實驗結果為先用樣品測出之吸光值代入上列公式中，求出相當之維生素 C 濃度後，再除以當次控制組的相當維生素 C 濃度，而得之百分比。

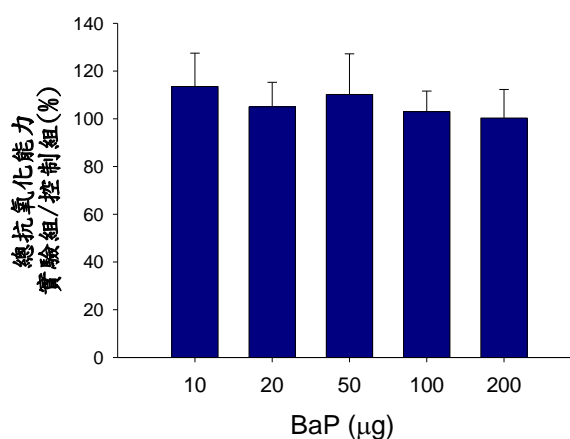




## 2. BaP 對 A549 細胞總抗氧化能力(TAC)影響之測定結果

表 12. A549 細胞加了 BaP 24 小時後的總抗氧化能力(TAC)測定結果

BaP 量( $\mu\text{g}$ )	TAC
10	$114.0 \pm 5.8\%$
20	$98.0 \pm 1.3\%$
50	$110.2 \pm 17.0\%$
100	$103.4 \pm 3.1\%$
200	$100.3 \pm 12.0\%$



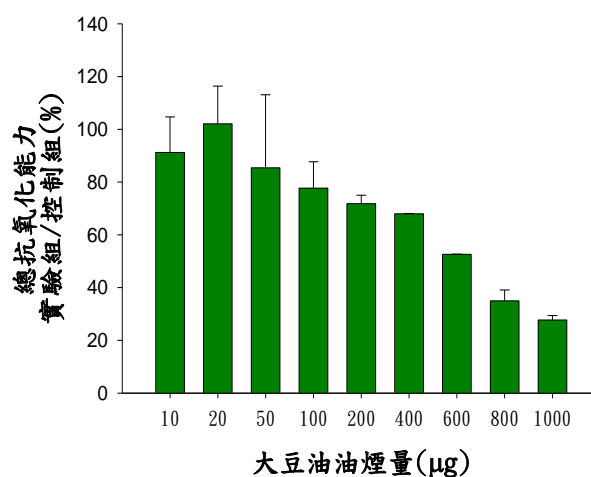
實驗結果顯示少量 BaP 對 A549 細胞的總抗氧化能力(TAC)並無明顯影響，與控制組相比其 TAC 約有 100-110%。當 BaP 的量增加時(10-200 $\mu\text{g}$ )，A549 細胞的 TAC 會輕微下降。

## 3. 油煙(COF) 對 A549 細胞總抗氧化能力(TAC)影響之測定結果

### (1)不同量的大豆油油煙對 A549 細胞 TAC 的影響

表 13. A549 細胞加不同量的大豆油油煙 24 小時後的總抗氧化能力(TAC)測定結果

COF 量( $\mu\text{g}$ )	TAC
10	$91.2 \pm 13.5\%$
20	$102.1 \pm 14.3\%$
50	$85.4 \pm 27.7\%$
100	$77.7 \pm 10.0\%$
200	$71.8 \pm 3.2\%$
400	$68.0 \pm 0.1\%$
600	$52.6 \pm 0.1\%$
800	$34.7 \pm 3.5\%$
1000	$27.7 \pm 1.7\%$

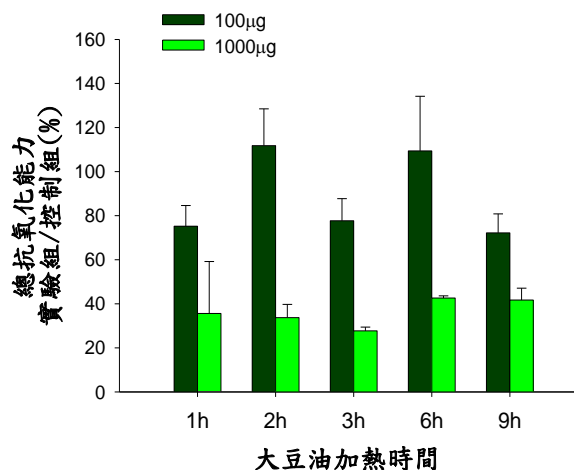


實驗結果顯示大豆油 COF 量越高，則 A549 細胞的 TAC 越低，COF 的量與 TAC 呈現相反的關係。

## (2) 加熱不同時間的大豆油油煙對 A549 細胞 TAC 的影響

表 14. A549 細胞加了加熱不同時間的大豆油油煙 24 小時後的總抗氧化能力(TAC)測定結果

加熱時間 (小時)	COF 100 $\mu$ g	COF 1000 $\mu$ g
1	75.2 $\pm$ 9.4%	35.6 $\pm$ 23.6
1-2	111.8 $\pm$ 16.7%	33.7 $\pm$ 6.0%
1-3	77.7 $\pm$ 10.0%	27.7 $\pm$ 1.7%
4-6	109.4 $\pm$ 24.8%	42.6 $\pm$ 1.0%
7-9	72.2 $\pm$ 8.6%	41.7 $\pm$ 5.4%

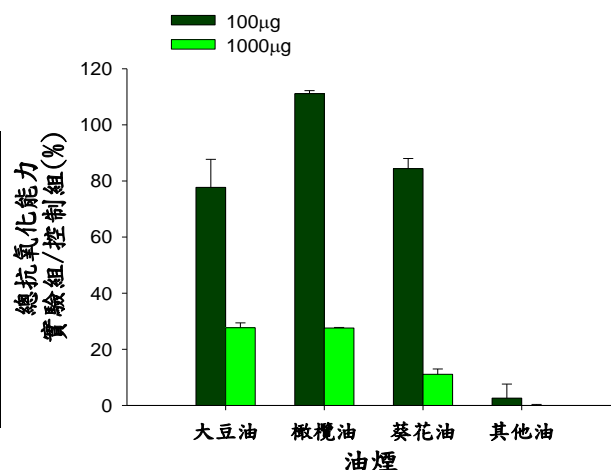


實驗結果顯示加熱不同時間時，COF 量為 100 $\mu$ g 時，TAC 差異性大，其中加熱 9 小時 TAC 最低。當 COF 量為 1000 $\mu$ g 時，各時間之 TAC 均明顯下降。

## (3) 不同油油煙(COF)對 A549 細胞 TAC 的影響

表 15. A549 細胞加了不同油油煙(COF) 24 小時後的總抗氧化能力(TAC)測定結果

油煙的種類	COF 100 $\mu$ g	COF 1000 $\mu$ g
大豆油油煙	77.7 $\pm$ 10.0%	27.7 $\pm$ 1.7%
橄欖油油煙	115.5 $\pm$ 30.9%	27.6 $\pm$ 0.2%
葵花油油煙	84.4 $\pm$ 3.6%	11.1 $\pm$ 1.9%
其他油煙	2.6 $\pm$ 5.0%	0.0 %



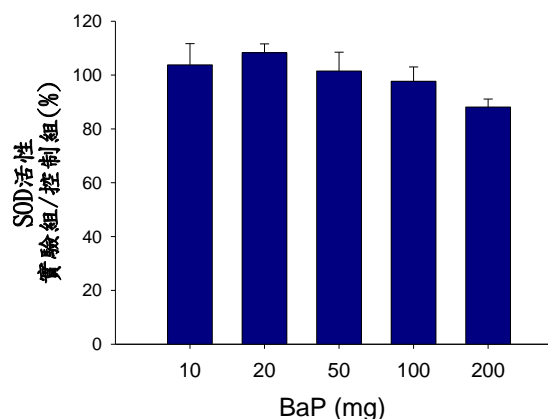
實驗結果顯示 COF 量為 100 $\mu$ g 時，橄欖油的 TAC 最高，最低者為其他油煙。當 COF 量為 1000 $\mu$ g 時，葵花油的 TAC 低於大豆油與橄欖油，但是其他油煙之 TAC 低至測不出。

## (二) 超氧離子歧化酶(SOD)活性測定結果

### 1. BaP 對 A549 細胞 SOD 活性影響之測定結果

表 16. A549 細胞加了 BaP 24 小時後的 SOD 活性測定結果

BaP 量( $\mu$ g)	SOD
10	103.8 $\pm$ 7.9%
20	108.3 $\pm$ 3.3%
50	101.5 $\pm$ 7.0%
100	97.7 $\pm$ 5.3%
200	88.1 $\pm$ 3.0%



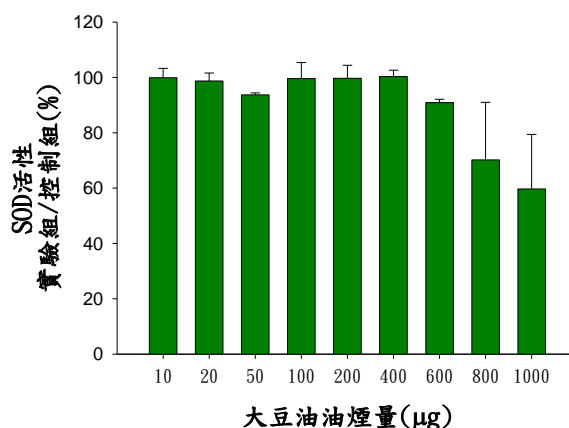
實驗結果顯示 BaP 會對 A549 細胞的總抗氧化能力(TAC)產生輕微影響。且 BaP 的量增加時(10-200 $\mu\text{g}$ )，24 小時細胞 TAC 活性會輕微下降，但全部的 SOD 活性都還有 88%以上。

## 2. 油煙(COF) 對 A549 細胞 SOD 活性影響之測定結果

### (1)不同量的大豆油油煙對 A549 細胞 SOD 活性的影響

表 17. A549 細胞加了不同量的大豆油油煙(COF) 24 小時後的 SOD 活性測定結果

COF 量( $\mu\text{g}$ )	SOD
10	99.9 $\pm$ 3.4%
20	98.7 $\pm$ 2.9%
50	93.7 $\pm$ 0.7%
100	99.6 $\pm$ 5.8%
200	99.7 $\pm$ 4.7%
400	100.3 $\pm$ 2.3%
600	90.6 $\pm$ 1.2%
800	70.2 $\pm$ 20.8%
1000	59.7 $\pm$ 19.7%

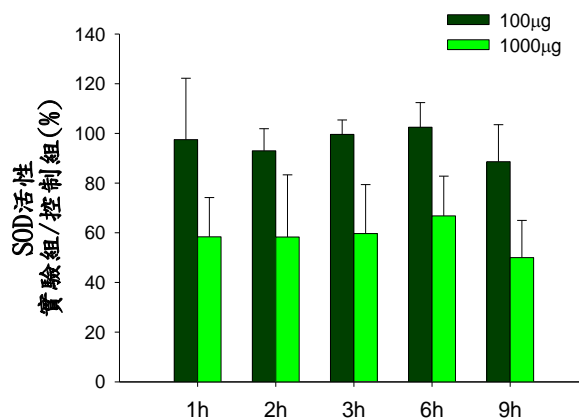


實驗結果顯示大豆油 COF 量自 10 $\mu\text{g}$  增加至 400 $\mu\text{g}$  時，A549 細胞的 SOD 活性都沒有明顯變化(近 100%)，當量到達 600-1000 $\mu\text{g}$  時，SOD 活性明顯依 COF 量的增加而下降。

### (2)加熱不同時間的大豆油油煙對 A549 細胞 SOD 活性的影響

表 18. A549 細胞加了加熱不同時間的大豆油油煙 24 小時後的 SOD 活性測定結果

加熱時間 (小時)	COF 100 $\mu\text{g}$	COF 1000 $\mu\text{g}$
1	97.5 $\pm$ 24.7%	58.4 $\pm$ 15.8%
1-2	93.0 $\pm$ 8.9%	58.3 $\pm$ 28.5%
1-3	99.6 $\pm$ 5.8%	59.7 $\pm$ 19.7%
4-6	102.5 $\pm$ 9.9%	70.1 $\pm$ 4.6%
7-9	88.6 $\pm$ 14.9%	66.4 $\pm$ 3.6%

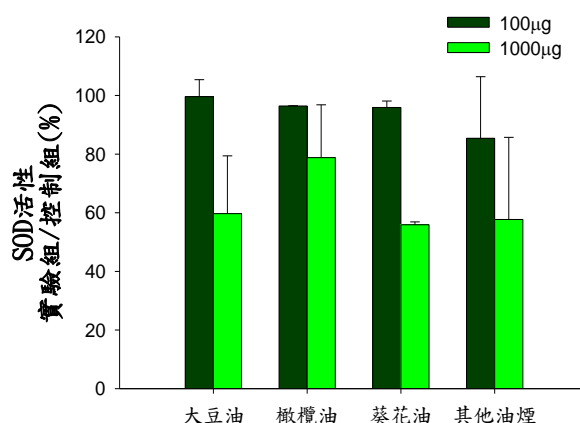


實驗結果顯示加熱不同時間，COF 量為 100 $\mu\text{g}$  時，SOD 活性都很接近，且皆有 90% 以上。當 COF 量為 1000 $\mu\text{g}$  時，各時間之 SOD 活性均明顯下降至 50-60%，各組間差異不大。

### (3)不同油油煙(COF)對 A549 細胞 SOD 活性的影響

表 19. A549 細胞加了不同油油煙(COF) 24 小時後的 SOD 活性測定結果

油煙的種類	COF 100µg	COF 1000µg
大豆油油煙	99.6 ± 5.8%	59.7 ± 19.7%
橄欖油油煙	96.4 ± 0.1%	78.8 ± 18.0%
葵花油油煙	95.9 ± 2.2%	55.9 ± 1.0%
其他油煙	77.9 ± 18.4%	57.7 ± 28.0%



實驗結果顯示不同油 COF 量為 100µg 時，SOD 活性都很接近，且皆有 80% 以上。當 COF 量為 1000µg 時，各時間與各種油煙之 SOD 活性均明顯下降，但各組間差異較大。比較加熱不同時間與不同種類的油時，COF 量為 100µg 時，SOD 活性都很接近，且皆有 80% 以上。當 COF 量為 1000µg 時，各加熱時間與各種油煙之 SOD 活性雖有下降，但仍有控制組的 60-80%，且各組間差異不大。

## 陸、討論

我們的實驗結果證實發現大豆油加熱越久，油煙量越多，且油的酸價變高，代表油質劣化更嚴重。BaP 的量會影響肺泡 A549 細胞的 24 與 72 小時存活率，而我們收集到的油煙對肺泡 A549 細胞的 24 與 72 小時存活率及抗氧化能力都會造成某種程度的影響，且與油煙量相關，但與加熱油的時間或時驗中使用的油品種類較無關。當油煙量很低(100µg)時，細胞存活率及抗氧化能力與未接觸油煙之對照組相近，當油煙量夠高(1000µg)時，肺泡 A549 細胞之存活率及抗氧化能力會明顯地大幅下降。有關本研究之討論如下：

### 一、大豆油、橄欖油、葵花油

大豆油、橄欖油、葵花油是我們常使用的三種烹調用油，因此本實驗選這三種油來研究。但是市面上賣的油種類很多，限於時間與經費，我們無法一一做研究，而且本實驗結果並無法判定那一種油產生的油煙對 A549 細胞傷害最少，所以我們無法對這三種油的油煙安全性下結論。但是不論是那一種油，只要油煙量夠高(1000µg)時，都會對 A549 細胞產生不良影響，所以我們建議盡量減少吸入油煙。

在實驗進行到一段落時，國內爆發假油事件。我們原來使用的是大統橄欖油，剛好被發現不是真正的橄欖油，當時只好重新購買進口的 100% 橄欖油，價格為原來的 2 倍。所有與橄欖油相關的步驟都全部重做，雖然多花不少時間，但為求實驗的正確性，重做是有必要的。這次事件提醒我們採購實驗用材料時，也要注意材料的品質與可信度。

## 二、油煙的可能成分

依據文獻報告，油煙中會有揮發的油脂，以及各種不同的多環芳香烴(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 縮寫 PAHs)。由已知的報告中提過曾在油煙中被發現的 PAHs 有十多種，本實驗使用的 BaP(Benzo[a]pyrene, C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>)是較常被提到的一種 PAH，其它也比較常被提到的成份還有 2-naphthylamine (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N)、4-aminobiphenyl (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N)...等。事實上，不少 PAHs 已被界定為致癌物。也有實驗報告發現若長期接觸高濃度 PAHs，可能會有引起肺癌、皮膚癌、胃癌及肝癌等疾病的風險。這些 PAHs 被發現可破壞細胞的遺傳物質，引發癌細胞增長，增加癌症的發病率。我們的實驗因為是短期的研究，而且使用的細胞株是已是肺腺癌細胞株，所以沒有進一步探討對細胞遺傳物質的影響，將來若有機會進一步研究，可以考慮使用非癌細胞株作癌症相關的研究。

有關收集到的油煙萃取物成份，值得進一步分析。但是油煙是混合物，且各種成分含量差異可能很大，PAHs 的含量可能很低，需要精密的分析儀器例如氣相層析質譜分析儀[Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer(GC-MS)]才能分析出油煙成份。這可以是將來進一步做研究的方向。此外，除 PAHs 外，油煙中還含有許多揮發的油脂，這些氣相油脂可能也是影響肺泡細胞的因素之一。

## 三、油煙收集

我們自己設計的油煙收集器是經過 3 次改良後的結果，雖然確實可以收集到油煙，但是可能仍有油煙流失，所以實際加熱所產生的油煙量會比我們收到的油煙量還要多。

此外我們收集的油煙是單純加熱的油煙，並非煎炒炸食物產生的油煙，所以本實驗結果並不能說明煎炒炸食物時產生油煙的結果。我們曾經嘗試炸馬鈴薯，但是需不斷打開不銹鋼桶而影響油煙收集。因此將來若要進行煎炒炸食物的油煙實驗，必須另行設計方便放食物進鍋與取出的裝置。

## 四、A549細胞

我們使用的A549細胞株是來自食品工業發展研究所細胞庫的肺腺癌細胞。這種細胞雖然是癌細胞，但是它保有肺泡上皮細胞之各種特性，所以是最常被用來做動物體外的肺細胞研究的細胞。既然使用的是肺腺癌細胞，實驗結果並不能100%推論於正常肺泡細胞上。但是正常肺泡細胞勢必比癌細胞脆弱，所以我們的實驗結果發現油煙量夠高時，肺泡A549細胞之存活率及抗氧化能力會變差，由此推論如果作用在正常肺泡細胞上，其存活率及抗氧化能力會更差。在油煙量很低時，我們發現對A549細胞沒有明顯的影響，但是如果長期暴露於低量油煙，是不是有可能對細胞產生影響呢？這是將來值得進一步做研究的地方。

此外，因為A549是癌細胞，在動物體外培養較容易成功，對從沒養過細胞的我們而言，困難度較低。在培養A549細胞的過程中，我們學到許多無菌技術，學會儲備冷凍細胞，也經歷了培養箱中細胞死光的慘況，也讓我們切身了解作細胞實驗的甘苦。另外做細胞實驗的好處是避免做動物實驗所造成的動物傷害，也避免做人體實驗的危險與傷害。

## 五、實驗一： BaP 對 A549 細胞之影響

我們所使用的苯並[a]芘(BaP)，是一種五環多環芳香烴，是已知的突變原和致癌物質。本實驗以BaP 做代表油煙中可能有的化學成份，探討其可能的影響。實驗初步結果顯示較高

量的BaP 與油煙會對A549 細胞會有一些影響，但是在 200  $\mu\text{g}$ 以下影響不大。因為BaP的溶解度很低，我們使用的DMSO是很好的溶劑，且可用於細胞冷凍保存，但是過高的DMSO仍有可能傷害細胞。所以我們最高只能泡出 10mg BaP/mL DMSO的濃度，而BaP最多能加的量只能到 200  $\mu\text{g}$ (含1% DMSO於培養液中)，所以本實驗所做的BaP量最高就只有200  $\mu\text{g}$ 。事實上，油煙中若含有BaP，其含量應該也是很低的，所以BaP測試的量不高也是合理的。

BaP既然是致癌物質，加在A549細胞上，有沒有可能反而讓癌細胞長得更快呢？我們的實驗結果並未發現這個情形。所以BaP可能是會讓正常細胞起變化變成癌細胞，但是對已是癌細胞的A549，並不會促進其生長，反而在BaP量較高時會有輕微抑制細胞生長的情形。

## 六、實驗二：油煙對A549 細胞生長之影響

我們的實驗結果發現對細胞存活率影響最明顯的是油煙量。至於加熱不同時間或不同種類的油煙，我們的實驗結果並未發現穩定的趨勢變化。

在24小時的觀察中，我們發現當大豆油油煙量達500 $\mu\text{g}$ 以上，A549細胞之存活率會明顯下降。在72小時的實驗中，我們發現在大豆油油煙量為 200-600 $\mu\text{g}$ 時，A549細胞存活率高於控制組，但油煙量達700 $\mu\text{g}$ 以上時，細胞存活率會明顯下降。我們推測油煙中可能含有各種不同成份的物質，有些有利於但有些有害於A549細胞生長。在油煙量少時，有利的成份影響較大，量多時，有害生長的成份影響較大。因此值得將來進一步探討油煙中不同成分對肺泡細胞的影響。

## 七、實驗三：BaP與油煙對A549 細胞抗氧化能力之影響

我們日常生活中可能會接觸到活性氧(reactive oxygen species)。過多的活性氧累積在體內可能會導致細胞損傷，進而造成許多身體的疾病，所以健康的身體可以經由細胞的抗氧化機制迅速有效地將過多的活性氧排除。如果細胞抗氧化能力變差，活性氧就容易累積在體內而破壞組織。吸入的油煙會直接到肺部，若造成肺泡細胞抗氧化能力降低就會引起肺臟疾病，甚至有致癌的風險。

超氧化物歧化酶是細胞內具有抗氧化能力的一種酵素，是細胞總抗氧化能力的一部分，也是研究細胞抗氧化能力常測定活性的物質。所以我們同時選用總抗氧化能力(TAC)試劑組與超氧化物歧化酶活性試劑組，來測定A549細胞受BaP與油煙刺激後對細胞抗氧化能力的影響。

我們的實驗結果顯示油煙量是影響細胞抗氧化能力最明顯的原因。在加熱不同時間或不同種類的油煙，我們沒有發現穩定的趨勢變化。

## 八、由實驗結果推論出的建議

綜合我們的實驗結果，證實油烹調後產生的油煙的確會影響肺泡細胞。當油煙量高到某一程度時，肺泡 A549 細胞的生長與細胞抗氧化能力就會明顯變差。

因此我們建議使用油品做炒炸煎等烹調時一定要開抽油煙機，盡可能排除油煙，以減少吸入油煙的量。還要定期檢查抽油煙機的功能，以免油煙抽出之效果不佳。此外也要盡量避免將油加熱到高過其冒煙點上，這樣才可以盡量減少冒煙量。如果有其他不需用油的烹調方式，例如蒸或燙，也可以避免油煙的生成，而減少吸入油煙的風險。

## 九、實驗心得與自我提醒

將近一年的時間我們進行這個研究，學了許多與研究相關的知識與技巧。這段過程中，我們需要妥善運用時間以及建立分析數據的能力，並且瞭解實驗的目的和流程。我們綜合幾點該常常自我提醒的重點如下：

1. 要注意不可在無消毒的情況下拿東西放進生物安全櫃。
2. 在加入 BaP 與 COF 時，要注意加到第幾個，以免加錯。
3. 使用恆溫水浴槽回溫藥品時，要注意水不可碰到瓶口，以免汙染。
4. 要隨時觀察細胞的生長情形，以免生長不佳或汙染造成實驗無法使用。
5. 用 PBS 洗 6 孔細胞盤的細胞時，要小心不要用太大的壓力以免沖下細胞，影響結果。
6. 在實驗室做實驗，需注意物品隨時歸位，且實驗廢棄物也需分類收集。
7. 作實驗要大膽假設，小心求證。

## 十、未來展望

基於目前的研究結果，將來可以從下面幾個方向做進一步研究：

1. 分析油煙中的各種化學成分，可以考慮使用氣相層析串聯質譜儀分析成分。
2. 分別探討各種油煙化學成分，包括脂肪酸，對肺泡細胞的影響。
3. 探討其他不同油品(例如豬油、花生油等)的油煙對肺泡細胞的影響。
4. 探討長時間少量油煙的接觸，對體外肺泡細胞及更進階的體內肺泡的影響。

## 柒、結論

- 一、大豆油加熱時間越久，產生的油煙量越多。
- 二、本實驗所使用的大豆油、橄欖油與葵花油三種油，在同樣加熱 3 小時後，產生的油煙量最多的是橄欖油，而加熱後油的酸價最高的是葵花油。
- 三、油煙與 BaP 對於肺泡上皮細胞確實會有某種程度的直接毒性與影響生長。
- 四、當加入細胞的油煙量夠高(> 600 $\mu$ g)時，會使 A549 細胞的生長受到明顯抑制，且油煙量與細胞存活率呈現相反關係。
- 五、當油煙量很低時，對於 A549 細胞的短期毒性與生長無明顯影響，但長時間的觀察與研究仍有其必要性。
- 六、油煙會對 A549 細胞的抗氧化能力的造成影響，且暴露量越高，影響越大。
- 七、本實驗收集的不同種類(大豆油、橄欖油、葵花油)或加熱不同時間(1, 2, 3, 4-6, 7-9 小時)的油煙，並未發現對 A549 細胞的存活率及抗氧化能力有明顯差異。
- 八、我們建議：烹調時，盡量不要將油加熱到溫度高於冒煙點，以免產生過多油煙而吸入肺部。同時。務必將抽油煙機打開來抽吸油煙，以盡量避免人體吸入過多的油煙。
- 九、總結：油加熱至超過冒煙點會產生油煙，當油煙量高到一個程度，就有可能對肺泡細胞造成傷害並影響到細胞生長及及抗氧化能力，所以過多的油煙對肺細胞會有不良影響，我們應盡量減少油煙的產生，並盡量避免吸入油煙。

## 捌、參考資料及其他

### 一、參考資料

1. Wu SC, Yen GC. (2004). Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells. *Toxicology in Vitro* 18, 571-580.
2. Wen Cheng Y, Lee H. (2003). Environmental exposure and lung cancer among nonsmokers: an example of Taiwanese female lung cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 21, 1-28.
3. Hung HS, Wu WJ, Cheng YW, Wu MF, Chang KL, Lee H. (2005). Cooking oil fumes improve lung adenocarcinoma cell survival through c-IAP2 induction. *J Toxicol Environ Health A* 68, 1525-1535.
4. Hung HS, Wu WJ, Cheng YW, Wu TC, Chang KL, Lee H. (2007). Association of cooking oil fumes exposure with lung cancer: involvement of inhibitor of apoptosis proteins in cell survival and proliferation in vitro. *Mutat Res* 628, 107-116.
5. Wu PF, Chiang TA, Wang LF, Chang CS, Ko YC. (1998). Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon contents of fumes from heated cooking oils and prevention of mutagenicity by catechin. *Mutat Res* 403, 29-34.
6. Chiang TA, Pei-Fen W, Ying LS, Wang LF, Ko YC. (1999). Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Food Chem Toxicol* 37,125-134.
7. 實驗 20 動物細胞培養。民 102 年 11 月 2 日，取自：  
<http://tns.ndhu.edu.tw/~life-science/exp/020.htm>.
8. 郝龍斌。廚房油煙會不會致癌。民 102 年 11 月 2 日，取自：  
<http://www.jtf.org.tw/health/Show.asp?This=210>。
9. 郝龍斌。抽油煙機會除油煙嗎？家庭主婦在廚房怎麼防？民 102 年 11 月 3 日，取自：  
<http://www.ucute.com.tw/puresun/index.aspx?act=article&aid=229993741>。
10. 食用炒菜油的「冒煙點」。民 102 年 11 月 3 日，取自：  
<http://www.tunghai74.org/letters/CookingOil.htm>。
11. 冒煙點。民 102 年 11 月 2 日，取自：  
<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E5%86%92%E7%85%99%E9%BB%9E>
12. Benzo(a)pyrene. 民 102 年 11 月 2 日，取自：[http://en.wikipedia.org/wiki/Benzo\(a\)pyrene](http://en.wikipedia.org/wiki/Benzo(a)pyrene)。
13. 苯并[a]芘。民 102 年 11 月 2 日，取自：  
<http://zh.wikipedia.org/wiki/%E8%8B%AF%E4%B8%A6%EF%BC%BBa%EF%BC%BD%E8%8A%98>。



## 【評語】 040818

1. 能由日常生活常遭遇的油煙對健康的影響出發，並尋求適合的實驗場域學習細胞組織生理研究，十分值得肯定。
2. 研究設計嚴謹，作品呈現合宜，作者報告自信且謙和，是件完整且成熟的作品。
3. 科學研究中，是否能得到新的發現，是研究重要的判準。也期許作者團隊能進一步的閱讀比較相關研究文獻，提出與現有研究中不同且重要的成果，將能使作品更具價值。