

R
008.8
7534-2
88

中山醫學院毒理學研究所碩士論文

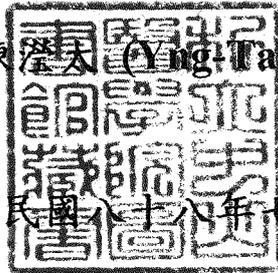
Master Thesis, Institute of Toxicology, Chung Shan
Medical and Dental College

指導老師：李輝博士 (Huei Lee, Ph. D.)

Benzo[a]pyrene 對人類肺腺癌 CL-3 和 A427
細胞週期的影響研究

Effects of Benzo[a]pyrene on cell cycle in
human lung adenocarcinoma CL-3 and A427 cells

研究生：陳澄太 (Ying-Tay Chen) 撰



中華民國八十八年七月

(July, 1999)

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C055186

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 毒理學研究所
八十七學年度第二學期取得 碩士學位之論文。

論文名稱：Benzo[a]pyrene 對人類肺腺癌 CL-3 和 A427 細胞週期的影響研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號: _____)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名: 李輝教授

研究生簽名: 陳漢太
(親筆正楷)

學號: R86505
(務必填寫)

日期: 民國 88 年 8 月 2 日

1. 本授權書請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請再交論文一本予畢業學校承辦人員或逕寄 106-36 台北市和平東路二段 106 號 1702 室 國科會科學技術資料中心 王淑貞。(本授權書諮詢電話: 02-27377746)
3. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿。
4. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

Benzo[a]pyrene 對人類肺腺癌 CL-3 和 A427 細胞週期的影響研究

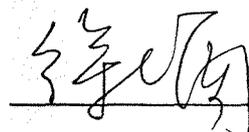
Effects of Benzo[a]pyrene on Cell Cycle in Human Lung Adenocarcinoma CL-3 and A427 Cells

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

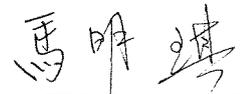
台中榮民總醫院教學研究部副研究員

徐士蘭 博士



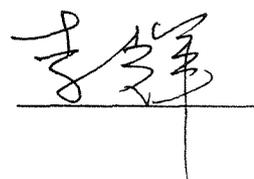
私立中山醫學院生物化學研究所助理教授

馬明琪 博士



私立中山醫學院毒理學研究所教授
(本論文指導教授)

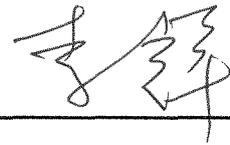
李 輝 博士



中華民國八十八年七月七日

學生陳澄太論文題目為 Benzo[a]pyrene 對人類肺腺癌 CL-3 和 A427 細胞週期的影響研究其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李 輝 博士 簽名：

A handwritten signature in black ink, appearing to be '李輝' (Li Hui), written over a horizontal line.

中華民國八十八年八月 日

謝誌

研究所生涯感謝恩師李輝教授的不倦教誨，與實驗室所有的師長與前輩熱情的協助，文稿初成承蒙台中榮民總醫院徐士蘭博士與本校生化所馬明琪老師的細心指導。

兩年來叩謝父母親在精神上的鼓勵和金錢上的支持，更感謝出嫁的三位姊姊，時常回家陪伴父母，讓我無後顧之憂。

感謝萬物。

陳滢太 謹誌於
中山醫學院毒理學研究所
中華民國八十八年七月三十一日

目錄

壹、 中文摘要	1
貳、 文獻綜論	3
一、 源起	3
二、 環境中強致癌物 B[a]P	4
三、 基因毒物和細胞週期	5
四、 細胞週期與其調控蛋白	8
1. 調控 G1 arrest 的蛋白	8
2. 調控 G2 arrest 的蛋白	8
參、 研究動機	10
肆、 材料與方法	11
一、 材料與藥品	11
1. 細胞培養	11
2. RNA 萃取與純化	11
3. 蛋白的萃取	12
4. RT-PCR	12
5. Western blot	12
二、 肺腺癌細胞株之來源與培養	13

三、 細胞解凍與保存	14
四、 細胞毒性試驗 (MTT assay)	14
五、 細胞增生試驗	15
六、 RNA 萃取與純化	16
1. RNA 萃取	16
2. RNA 純化	17
七、 p21 ^{WAF1/CIP1} 之 RT-PCR 分析	17
八、 蛋白萃取及定量分析	18
九、 蛋白之西方墨點法 (Western blot)	19
十、 Flow cytometry	20
伍、 結果與討論	22
一、 B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞株之細胞毒性試驗	22
二、 B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞株生長之影響	22
三、 B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞之 p53 和 p21 表現之影響	24
四、 B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞週期的影響	27
五、 CL-3 細胞之細胞週期調控蛋白 在細胞週期中扮演的角色	30
陸、 參考文獻	34
柒、 表與圖	51
捌、 英文摘要	67

Abbreviations

Ammonium persulfate	APS
α -naphthoflavone	α -NF
Benzo[a]pyrene	B[a]P
Anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene	BPDE
Cytochrome P450 IA1	CYP1A1
Diethylpyrocarbonate	DEPC
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dithiothreitol	DTT
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Enhance chemiluminescence	ECL
Ethylene diaminetetraacetic acid	EDTA
Ethidium bromide	EtBr
Fetal bovine serum	FBS
Non essential amino acid	NEAA
Polycyclic aromatic hydrocarbon	PAH
Phosphate buffered saline	PBS
Polyacrylamide gel electrophoresis	PAGE
Protein kinase C	PKC
Reverse transcription-polymerase chain reaction	RT-PCR
Sodium dodecyl sulfate	SDS
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	TCDD
Trypsin and EDTA	T/E
Tetramethyl ethylenediamine	TEMED



壹、中文摘要

肺癌已成為台灣地區癌症死亡的頭號殺手。而環境因子可能是肺癌發生的重要影響因子，本研究主要在探討在肺細胞上造成之基因毒性和細胞週期之相關性。實驗室先前研究發現以 Benzo[a]pyrene (B[a]P) 處理會導致肺腺癌 CL-3 和 A427 兩株細胞產生不同程度的 DNA 傷害，其中 CL-3 細胞會產生高量的 DNA 鍵結物，而 A427 細胞則幾乎不會形成 DNA 鍵結物。本研究欲瞭解環境污染物 B[a]P 在肺細胞上所引起的基因毒性，如何影響細胞週期。

經 B[a]P 處理的 CL-3 細胞會停止生長，而 A427 細胞生長則不會停止，顯示 CL-3 細胞的週期可能受到 B[a]P 的影響；以西方墨點法分析調控細胞週期之相關蛋白的變化。發現已知會引起細胞停在 G1 期之 p53 蛋白，經 B[a]P 處理後的 CL-3 細胞有被誘發而增高的現象，若以反轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)分析 p21 mRNA 的表現，則發現 p53 會轉錄活化 p21 基因的表現，但 p21 蛋白卻沒有增高。p21 的基因表現和蛋白的表現量不一致，這顯示有其他的機制參與 p21 蛋白的消失。

進一步以流式細胞儀 (flow cytometry) 來分析細胞週期的分佈，發現 CL-3 細胞經 B[a]P 處理之後，其 G1 期與對照組比較並沒有顯著的增加。在 S 期方面，發現 S 期有降低的情形，顯示 B[a]P 會抑制 CL-3 細胞 DNA 的合成，這可能和 CL-3 細胞有高量的 DNA 鍵結物之間有相關性。且 S 期的降低似乎與 p21 與 PCNA 之間的交互作用有關。另外，在經 B[a]P 處理時發現含有 wild-type p53 基因的 CL-3 細胞會產生 G2/M phase arrest 的情形。進一步以西方墨點法分析細胞週期調控蛋白的變化，已知經由 p53 降解 cyclin B1 會導致細胞無法由 G2 進入 M 期停止，實驗結果在 G2/M 期高時 cyclin B1 的表現幾乎無法測到，而在 cyclin B1 表現時細胞又可以由 G2 進入 M 期，顯示由 cyclin B1 降解會導致 G2 arrest 的發生，但是 p53 蛋白的變化似乎不參與 cyclin B1 的降解，且 p53 的下游 p21 蛋白亦不參與 G2/M 期的停止；另外 MDM2 的表現與 p53 蛋白一致，可能是 p53 轉錄活化 MDM2，又 MDM2 回饋抑制 p53 之功能，使 p53 喪失參與細胞週期停止的功能。綜合以上結果，B[a]P 所造成肺腺癌細胞 CL-3 的 G2/M phase arrest 是經由 p53-independent pathway 或其他轉錄活化因子所造成的。

貳、文獻綜論

一、源起

由於台灣地區肺癌發生率及死亡率近年來有逐漸升高的趨勢，在民國八十六年肺癌死亡率一度高於肝癌的死亡率，而成為癌症死亡率的第一位(衛生署，生命統計，1997)。由於台灣地區環境因子複雜，而肺臟又是直接暴露環境因子的標的器官，因此推測台灣地區肺癌發生與環境因子間有某種程度的相關性。或許與其他國家肺癌的形成機轉上有些不同。本研究室先前研究發現環境中強致癌物 Benzo[a]pyrene (B[a]P)會促使台灣肺腺癌 CL-3 細胞產生高量的 DNA 鍵結物 ($367.63 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$)，而美國肺腺癌 A427 細胞則幾乎不形成 DNA 鍵結物的形成 ($0.36 \text{ adducts} / 10^8 \text{ nucleotides}$)，且在比較兩株細胞代謝 B[a]P 的 cytochrome P450 IAI (CYP IAI) 酵素活性和 AhR 路徑調控 CYP IAI 基因表現的機轉時，發現 CL-3 細胞 CYP IAI 的酵素活性遠高於 A427 細胞。同時 CL-3 細胞之 CYP IAI 的基因表現是透過 AhR 路徑所調控而表現較高的 CYP IAI，因此 CL-3 細胞有較高的 B[a]P-DNA 鍵結物可能是 CL-3 細胞的 AhR 路徑轉錄活化 CYP IAI 的活性較 A427 細胞高而造成代謝出 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetra-hydrobenzo[a]pyrene (BPDE) 的能力較高所致 (Chen,

Master Thesis, 1996)。本研究即著重在探討環境污染物 B[a]P 在肺細胞上所引起的基因毒性，如何影響細胞週期變化。

二、環境中強致癌物 B[a]P

多環芳香烴是一種廣泛存在環境中的污染物，它的種類非常多，通常是經由有機物不完全燃燒所產生的。在多環芳香烴類化合物的致癌性方面研究中，以 B[a]P 的強致癌性最被廣泛研究 (Angerer et al., 1997)。

有關 B[a]P 的代謝活化已有相當多的研究 (Sundaresan et al., 1995; Flower-Geary et al., 1995; Stacey et al., 1998)。B[a]P 有許多代謝路徑，其中主要經由 cytochrome P450 IAI 酵素系統代謝活化生成(-)-trans-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene，然後再繼續氧化形成，anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetra-hydrobenzo[a]pyrene (BPDE) 最終代謝產物，它會直接攻擊 DNA，因此具有致突變性、致癌性和致腫瘤性。而代謝產物主要攻擊 DNA 的 dG 之 N2 位置，而形成 BPDE-N2-dG DNA 鍵結物。

另一個主要代謝路徑是單電子氧化 B[a]P，而產生 radical cation，

它會攻擊 DNA 的 deoxy-guanosine 之 N7 胺基的位置，而形成 DNA 鏈結物。DNA 鏈結物已被認定為致癌物引起細胞 DNA 傷害的生物指標 (Ben van et al., 1997)，因此 DNA 鏈結物之含量可以反應細胞內對外來物的代謝活化、解毒作用及 DNA 修復之反應的最終結果 (Beach et al., 1992)。同時 DNA 鏈結物的形成與細胞的轉型或誘發癌症發生有密切的相關性。

肺臟是暴露空氣污染物的標的器官，Weyand et al., (1986) 以 B[a]P 直接噴入老鼠氣管內，五分鐘之後，無論在肺臟或肝臟中都可以測到 Quinone 類的 B[a]P 代謝物，例如 B[a]P-1,6-quinone、B[a]P-3,6-quinone 及 B[a]P-6,12-quinone。而肺臟代謝 B[a]P 的速率比肝臟較為快速。因此本研究擬以人類肺腺癌細胞株 CL-3 和 A427 來探討暴露不同濃度的 B[a]P 所造成之基因毒性不同對細胞週期的影響，同時也追蹤分析細胞週期調控蛋白之變化。

三、基因毒物和細胞週期

Jocelyn et al., (1998) 以基因毒物 cisplatin 和 UV-radiation 處理 normal human fibroblasts (NHFs)，細胞週期會發生 G2/M arrest，且發現 p53 蛋白會參與 G2/M arrest，若以 p53 anti-sense oligonucleotides 去抑

制 NHFs 之 p53 表現，再以 cisplatin 和 UV-radiation 處理，發現 G2/M arrest 有更增高的情形，因此推測 p53 並未直接參與誘導 G2/M arrest 的發生，但這個現象只有在細胞經基因毒物處理之後，沒有產生 G1 arrest 的情形下，才會被觀察到。因此抑制人類正常纖維母細胞 p53 蛋白的表現，會使細胞對基因毒物更為敏感。

Magali et al., (1998) 以七株不同的細胞株，colon adenocarcinoma HCT、LoVo、LS174T，Breast adenocarcinoma CAL51、MCF7、T47D，skin fibroblasts in secondary culture NDF，其中除了 T47D 的 p53 為 mutant type，其餘的細胞株均為 wild-type p53；在經 γ -radiation 處理 24 小時之後，發現細胞週期均會發生改變，其中含 wild-type p53 的細胞株均會發生 G1 或 G2 arrest 的情形，且需要 p53 蛋白的參與；然而本身為 mutant p53 的 T47D 細胞，經 γ -radiation 處理 24 小時之後發現，細胞會產生 G2 phase arrest 且有死亡的現象，但 p53 並沒有被誘發而增加表現。經 γ -radiation 處理之後含有 wild-type p53 的細胞，造成細胞週期的改變需要 p53 蛋白的參與，然而含有 mutant p53 的細胞所產生的 G2 arrest 卻沒有誘發 p53 蛋白的增加，因此先前研究基因毒物造成細胞產生 G1 和 G2 arrest，在含有 wild-type p53 之細胞株才會發生，而在含有 mutant p53 的細胞在經基因毒物處理之後，則會產生 G2 arrest 的現象。又 Bunz et al., (1998) 研究發現，含有 wild type p53 的細胞，經 γ -radiation 和 Nocodazole 處理細胞，發現細胞會有 G2

arrest 的情形，同時發現 p53 和 p21 的表現增高的現象，p53 和 p21 皆會參與 G2 arrest 的發生，顯示 wild type 的 p53 和 p21 會參與 G2 arrest 的發生。

Cyrus et al., (1997) 以 Benzo[a]pyrene (B[a]P) 處理含有 mutant-type p53 之 swiss 3T3 fibroblasts，發現細胞會有 G1 arrest 的情形發生，同時發現 p53 蛋白會被誘發而增高；又以 AhR 的抑制劑 α -naphthoflavon 去抑制細胞誘發代謝 B[a]P 之 CYP IAI 的路徑的 AhR，然後再以 B[a]P 處理，發現細胞沒有 G1 arrest 的現象，另外以 B[a]P 處理 p53 -/- knockout mice，發現細胞週期還是有 G1 arrest 的現象。這結果顯示 B[a]P 所導致的 G1 arrest 並非經由 p53 蛋白所調控。

不同細胞經不同基因毒物處理所產生的細胞週期停止結果不同 (Patricia et al., 1998)，含有 wild-type p53 基因的細胞經基因毒物處理後，會導致細胞停止在 G1 時期 (Natalia et al., 1996)，但 p53 蛋白不一定會參與細胞週期的停止，但 p53 則會參與 G2 arrest；含有 mutant-type p53 基因的細胞經基因毒物處理之後，所產生的 G1 或 G2 arrest，皆不一定需要 p53 蛋白的參與 (Munna et al., 1995)。

四、細胞週期與其調控蛋白

1. 調控 G1 arrest 的蛋白

p53 為一種抑癌蛋白，當細胞受到基因毒物的傷害之後，會誘發細胞 p53 蛋白的堆積(Kastan et al., 1991; Fritsche et al., 1993; Richard et al., 1998)，且會造成細胞生長的停止。已知細胞經基因毒物傷害後會導致細胞週期停止在 G1/S 期，是經由 p53 蛋白轉錄活化 $p21^{WAF1/CIP1}$ 基因(Andrei et al., 1999)，而 p21 蛋白會抑制細胞週期由 G1 期進入 S 期所需的 cyclin-dependent kinase (Cdk)，如 Cdk2、Cdk3、Cdk4 和 Cdk6 kinase，而使細胞停止在 G1 期而無法進入 S 期(Charles et al., 1994; 1996; Faina et al., 1996; Shunsuke et al., 1997)。

2. 調控 G2 arrest 的蛋白

許多研究顯示細胞經基因毒物處理之後，會產生 G2 arrest 的現象(Atsushi et al., 1998; Ruth et al., 1998)，且 p53 蛋白會參與調控 G2 arrest

的產生。Steven et al., (1999) 研究發現 p53 會調控的 G2 arrest，可能是經由 p53 抑制 cyclin B1 的轉錄活化，而降低 cyclin B1 的表現所導致。但 Winters et al., (1998) 發現經基因毒物 γ -radiation 處理沒有 p53 基因之人類細胞 H1299，所產生的 G2 arrest 是經由抑制 Cdc2 與 cyclin B1 的磷酸化，而使細胞無法由 G2 期進入 M 期所導致 (Zoe et al., 1999)。在缺乏 p53 和 p21 的老鼠和人類細胞經基因毒物處理之後，所產生的 G2 arrest，這種細胞生長停止可能是經由活化一種 protein kinase Chk1，磷酸化的 Chk1 會抑制去磷酸化酵素 Cdc25 的功能 (Paule et al., 1994; 1997)，沒有去磷酸化功能的 Cdc25 無法將 Cdc2 去磷酸化，而細胞無法由 G2 期進入 M 期，使細胞週期停止在 G2 期。在 p53 和 p21 突變的細胞株所產生的 G2/M arrest，可以經由 Chk1-Cdc25C-Cdc2 這種路徑來解釋。

參、研究動機

已知環境中主要的污染物為多環芳香煙，而多環芳香煙中又以 B[a]P 的致癌性較為強，且 B[a]P 為一種基因毒物，其活化的代謝產物會攻擊 DNA 而形成 DNA 鏈結物。過去研究發現細胞受到基因毒物傷害時，會使細胞產生一連串的變化，包括細胞死亡、生長停止、或走向腫瘤化的地步。實驗室之前研究發現，本身含有 wild-type *p53* 基因的台灣肺腺癌 CL-3 細胞，和美國肺腺癌 A427 細胞，在經基因毒物 B[a]P 處理後，CL-3 細胞會產生高量的 DNA 鏈結物，而 A427 細胞則不會產生高量的 DNA 鏈結物，且 CL-3 細胞會停止生長而 A427 細胞則不會停止生長；然而兩株細胞所受到的傷害相同，但所表現的結果卻不同，是否與其細胞週期變化有所關連？

當細胞受到基因毒物傷害時細胞會停止生長，受損的細胞停止生長以使細胞進行修復的工作，或細胞走向程序性死亡；已知 *p53* 為抑癌蛋白，且會調控細胞週期的變化，本實驗為了瞭解細胞經 B[a]P 處理之後所產生的基因毒性與其細胞週期變化，與調控細胞週期蛋白之間的關係？

肆、材料與方法

一、材料與藥品

1. 細胞培養

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids (NEAA), trypsin 購自美國 Life Technology 公司。細胞培養皿購自丹麥 Nunc 公司, Benzo[a]pyrene (B[a]P), 購自美國 Sigma 公司, dimethyl sulfoxide (DMSO) 購自德國 E. Merck 公司。

2. RNA 萃取與純化

TRIzol Kit, RNasin 購自美國 Life Technology 公司。DNase, MgCl₂, isopropanol, DEPC (Diethyl pyrocarbonate), DL-Dithiothreitol

(DTT) 購自美國 Sigma 公司。SDS， EDTA， NaOH， NaOAc， Tris-base 購自德國 E. Merck 公司。

3. 蛋白的萃取

Bio Rad protein assay kit 購自 Bio Rad 公司。Protein standard (bovine serum albumin) 購自美國 Sigma 公司。

4. RT-PCR

SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase， 100mM dNTP， primer 購自美國 Life Technology 公司。Oligo primer， 100 bp Ladder， DyNAzyme™ II DNA polymerase 購自美國 Bio-Labs 公司。TaKaRa Ex Taq™ 購自日本 TaKaRa Shuzo 公司。

5. Western blot

SDS, Tris, polyacrylamide, glycine, glycerol, EDTA 購自德國 E. Merck 公司。APS (Ammonium persulfate), PVDF membrane, ECL+plus (Enhance chemiluminescence) 購自英國 Amersham Pharmacia Biotech 公司。Coomassie blue, 2-mercaptoethanol, bromophenol blue, TEMED(N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine), Tween-20 購自美國 Sigma 公司。Acetic acid, methanol 購自台灣皓峰公司。p53 一次抗體 p53 (DO-7)購自丹麥 DAKO 公司。p21 一次抗體 WAF1(Ab-1)購自美國 Oncogene 公司。MDM2 一次抗體 MDM2(SMP14), cyclin B1 一次抗體 cyclin B1(H-433), PCNA 一次抗體 PCNA(PC10)購自美國 Santa Cruze 公司。X-ray film 購自日本 Fujil 公司。Protein maker:RAINBOW RPN 800(購自 Amersham LIFE SCIENCE)

二、肺腺癌細胞株之來源與培養

台灣肺腺癌細胞株 CL-3 細胞是由台大醫院內科楊泮池醫師分離培養出來，並由其提供本研究室持續培養。CL-3 細胞株是屬於 lung adenocarcinoma cell line，他在形態學上較屬於 epithelial-like cell。美國肺腺癌細胞株 A427 細胞則是向美國 American type culture collection

(ATCC) 購得。CL-3 與 A427 細胞株均以含有 10 % Fetal bovine serum (FBS), 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 mM non-essential amino acid (NEAA) 和 0.03 % penicillin/streptomycin (100 U/ml) 之 DMEM medium 培養, 置於 5 % 的 37 °C CO₂ 恆溫培養箱內培養。

三、細胞解凍與保存

由液態氮筒中取出細胞, 迅速放入 37 °C 水浴中, 使其快速解凍, 將解凍之細胞移至含有 37 °C 培養液之離心管中, 以 800 rpm 離心 5 分鐘, 除去上清液, 以含有 10 % FBS 之 DMEM 培養液培養之, 培養方法如前節所述。欲保存之細胞以胰蛋白酶 (trypsin /EDTA) 處理, 以單離細胞, 以 800 rpm 離心 10 分鐘, 除去上清液, 加入含有 10 % FBS 及 10 % DMSO 之 DMEM 培養液, 再取部分完全均勻的細胞懸浮液以細胞自動計數器算細胞數目, 以每管 1×10^6 個細胞數放入 cryotube 中, 放於 -20 °C 冰箱 4-5 小時後移至 -80 °C 冰箱 8-10 小時, 最後移至液態氮筒中儲存。

四、細胞毒性試驗(MTT assay)

試驗方法參考 Plumb et al., (1989)，活細胞會將 MTT 代謝而產生藍紫色的結晶，此藍紫色結晶可溶於異丙醇中，故測其吸光值大小可得知細胞數目的多寡，可藉此判斷藥物對細胞的毒性。

取 2×10^5 個細胞種在 24 well 的培養皿中，置於 5% CO₂ 的 37 °C 恆溫培養箱中培養 24 小時，以不同濃度的 B[a]P 處理細胞 24 小時，將含不同濃度 B[a]P 之培養液移除，以含 MTT (5mg/ml) 之培養液培養 4 小時，將培養液移除，加 1 ml DMSO 溶解 formazen，再加入 125 μ l Sorensin's glycine buffer (0.1M glycine plus, 0.1 M NaCl, pH 10.5)，以波長 570 nm 測定其吸光值。以 DMSO 組 survival rate 為 100%。
 $\% \text{ survival rate} = (\text{O.D. of test group} - \text{O.D. of blank}) / (\text{O.D. of DMSO control group} - \text{O.D. of Blank}) \times 100\%$ 。因此 % of survival rate 值愈小，則測試組的細胞毒性愈大。

五、細胞增生試驗

將 1×10^6 個細胞種於 100 mm 培養皿中 24 小時後，以含有不同

濃度的 B[a]P 之新鮮培養液處理 24 小時後，將含有 B[a]P 之培養液移除，並以 PBS 沖洗二次，以移除殘留的 B[a]P，防止 B[a]P 與細胞繼續作用，然後將處理過的細胞取 2×10^5 個細胞種至 10 個 60 mm 培養皿中繼續培養，之後每一日收取兩盤計數其細胞數目，以 log phase 計算出該細胞增殖兩倍的時間 (doubling time)，這即是該細胞一個細胞週期所需的時間。

六、RNA 萃取和純化

1. RNA 萃取

將 1×10^6 個細胞種於 10 cm^2 經 24 小時後，加藥處理之細胞，將細胞收下後加入 1 ml TRIzol，於室溫反應 10 分鐘以便水解細胞，待細胞完全水解後加入 200 μl 氯仿(chloroform)混合均勻，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液，再加入 500 μl isopropanol 於室溫反應 15 分鐘以便沈澱 RNA，之後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後除去上清液，將沈澱物以 75 %酒精去除殘留的鹽類，再離心留下 RNA 沈澱物，溶於 50 μl DEPC-H₂O。上述方法是依 TRIzol reagent (Life Technology, USA) 所附的說明書之步驟進行。

2. RNA 純化

溶於 50 μ l DEPC-H₂O 的 RNA，加入 10 μ l 100 mM MgCl₂/1M DTT，0.1 μ l RNasin (25-50 U)，0.1 μ l DNase I (6.94 mg/ml)，40 μ l DEPC H₂O 於 37°C 反應 15 分鐘以去除多餘的 DNA，以 5 mM EDTA、750 mM sodium acetate、0.1 % SDS，終止 DNase I 的反應。以 phenol/chloroform 萃取去除蛋白，12,000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液，加入 500 μ l isopropanol 於室溫反應 15 分鐘以沈澱 RNA，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘倒掉上清液，以 75 % 酒精洗去殘留的鹽類，之後離心留下 RNA 沈澱物溶於 50 μ l DEPC H₂O 中，用於 RT-PCR 分析前先以 denature agarose gel 確定 18 S 及 28 S rRNA 是否存在，以確保 RNA 的品質。以紫外線光譜儀測定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值應在 1.7 到 1.9 之間。RNA 的濃度以下列的公式計算：
RNA (μ g/ml) = A₂₆₀ × 40 × 稀釋倍數。

七、*p21^{WAF1/CIP1}* 之 RT-PCR 分析

取 5 μ g RNA 以 5 pmole/ μ l oligo dT 為 primer，於 72 °C 反應 10 分鐘，使 oligo dT 接合到 RNA 模板上，再加入 4 μ l 反轉錄酵素反應

buffer 及 2 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l 10 mM dNTP mix 在 42°C 下作用 2 分鐘後，再加入 1 μ l 反轉錄酵素(reverse transcriptase)，在 42°C 下作用 50 分鐘合成 cDNA 用做 PCR 分析用。PCR 反應條件如下：cDNA 1 μ l, 0.5 mM dNTP, 5 μ l PCR reaction buffer, 2.5 U Taq polymerase, 0.5 mM primer, (*p21^{WAF1}* sense: 5'-GCGACTGTG-ATG-CGCTAATG3'; *p21^{WAF1}* antisense: 5'AGAAGATCAGCC-GGCGTTTG3') (Clasen et al., 1998), 其總反應體積為 50 μ l, 置入 PCR 中以 94 °C 1 分鐘, 54 °C 1 分鐘, 72 °C 1 分鐘等反應條件重複 30 cycles, 最後以 72 °C 反應 6 分鐘。反應所得之 PCR 產物以 2 % agarose gel 進行電泳分析, 並以 ethidium bromide 染色判讀。

八、蛋白質萃取及定量分析

將 1×10^6 個細胞種於 10 cm² 經 24 小時後，加藥處理之細胞，將細胞收下，加入 1 ml 的 2 × cold lysis buffer (200 mM NaCl、0.4 % NP-40、0.4 % Sodium deoxycholate、0.2 % SDS、100 mM Tris-HCl pH 8.0), 置於 94 °C 之 dry bath 反應 25 分鐘，以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液用作蛋白定量及分析，整個過程應保持在冰浴以免變性之蛋白再 renature。

蛋白定量以 Bio-Rad Protein Assay Kit 分析，原理及方法簡述如下：利用 alkaline copper-phenol 試劑和 tyrosine/tryptophan 反應形成藍黑色複合物，以 595 nm 測定其吸光值，並以蛋白質標準品 bovine serum albumin (BSA) 所測得的標準曲線來計算樣品中蛋白質的濃度。將蛋白樣品稀釋 5 倍後加入 1 ml 以 1:4 稀釋的 Bio-Rad Protein Assay Reagent 充分混合均勻，以紫外線光譜儀在波長 595 nm 測定其吸光值，並將蛋白質標準品測得之吸光值畫成標準曲線，利用此標準曲線來計算樣品中蛋白質的濃度。

九、蛋白之西方墨點分析 (Western Blot)

取 50 μ g 蛋白加入 1/2 體積 3 x sample buffer 在 94°C 下作用 5 分鐘使蛋白變性。然後將蛋白樣品以 10 % polyacrylamide gel 進行 p53、p21、MDM2、cyclin B1、PCNA 蛋白電泳分析電泳完成後，將 NC membrane 平鋪在以 transfer buffer 潤溼的濾紙上，再以 transfer buffer 濕潤 NC membrane 後再將膠平鋪在上面然後再蓋上一濕潤的層濾紙，膠面向陰極而 NC membrane 面向陽極，放入 transfer tank 以 25 V 進行 20 小時之蛋白轉移，然後將 NC membrane 取出，放入含 5 % 脫脂奶

粉的 TBS buffer(含 0.1 % Tween 20)中，置於室溫緩慢搖動 2 小時，將牛奶倒掉加入 p53 (500×) (Santa Cruz, USA)或 p21WAF1/CIP1 (200×) (Oncogene Research Products)或 MDM2 (500×) (Santa cruz , USA) 、 cyclin B1 (200×) (Santa cruz , USA)或 PCNA (500×)(Santa cruz , USA) 一次抗體室溫反應 50 分鐘，然後以含 5 %脫脂奶粉的 TBS buffer(含 0.1 % Tween 20)清洗三次，每次 5 分鐘之後將牛奶倒掉後加入二次抗體 anti-mouse IgG (1000×) (anti-mouse monoclonal p53、p21、MDM2、PCNA) 或 anti-rabbit IgG (2000×) (anti-rabbit polyclonal cyclin B1)，室溫反應 30 分鐘，重複上述清洗步驟，最後加入 ECL+plus 反應 5 分鐘，再以 X 光片曝光後，以 Densitometer 分析(V.Krutovskikh et al., 1994)。

十、Flow cytometry (Lee et al., 1997)

將 1×10^6 個細胞種於 10 cm^2 經 24 小時後，加藥處理之細胞，分別處理 0、1、2、4、8、12、24 小時將細胞收下，先以 $1 \times \text{PBS}$ 將細胞洗二次後，以 trypsin-EDTA solution 進行 trypsinize 後，加入含有 FBS 的培養液終止其作用，並將細胞收下，以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 800 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，再以 $1 \times \text{PBS}$ 洗兩次，然後加入 1 ml 70 % 酒精置於 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 至少 18 小時，以 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 800 rpm 離心 5 分鐘，去除上清

液，再以 1 × PBS 洗兩次，加入 1 × PBS 500 ml 在加入 0.5 ml (1 mg/ml) RNase 於室溫反應至少 30 分鐘，在加入 0.5 ml 的 (150 ul/ml) propidium iodide 於室溫反應至少 30 分鐘，以 BECTON Dickoson 進行流式細胞計數儀分析細胞在不同細胞週期的分佈情形。

伍、結果與討論

一、B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞株之細胞毒性分析

為了瞭解肺腺癌細胞株 CL-3 及 A427 經 B[a]P 處理後，是否會對細胞產生細胞毒性，於是我們以 MTT assay 方法，分別以 1.0 μM 和 10.0 μM 兩種不同濃度的 B[a]P 處理肺腺癌細胞 CL-3 與 A427 兩種細胞株 24 小時，以分析其是否造成細胞毒性。結果如 Table 1 所示，細胞的存活率均在 90% 以上，顯示 B[a]P 並不會對 CL-3 與 A427 兩株細胞產生細胞毒性，即使在高濃度 10.0 μM 之 B[a]P 處理之下，兩株細胞株也都沒有細胞毒性產生。因此本研究即以 1.0 和 10.0 μM 兩種 B[a]P 濃度進行實驗。

二、B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞生長之影響

為了瞭解細胞受到 B[a]P 處理後所造成之 DNA 傷害是否會影響細胞的生長，於是將 CL-3 與 A427 兩種細胞分別處理 B[a]P 24 小時之後，更換沒有含 B[a]P 之新鮮培養液，繼續培養五天，以進行細胞

生長情形的分析。結果如 Fig. 1 所示，由對照組我們可以算出 CL-3 與 A427 細胞株之細胞呈對數生長時的 doubling time，CL-3 細胞為 24.71 小時，A427 細胞為 21.52 小時，但 CL-3 細胞經 B[a]P 處理之後顯然細胞的 doubling time 有改變。

另外 A427 細胞無論以 1.0 μM 或是 10.0 μM 的 B[a]P 處理，細胞仍然維持正常的生長速度，但在 CL-3 細胞株可觀察到高濃度 10.0 μM 之 B[a]P 處理 24 小時後，將 CL-3 細胞株繼續培養 5 天後，其細胞數約為控制組的 23.3%，CL-3 細胞生長速度明顯受到抑制。其每天的生長趨勢如 Fig. 1 所示。

由以上結果可知 B[a]P 對 A427 與 CL-3 兩種細胞不會造成細胞毒性，但會抑制 CL-3 細胞的生長，這可能和 B[a]P 會引起 CL-3 細胞形成 DNA 鍵結物有關。Ramet et al. (1995) 指出 A427 細胞以 B[a]P 處理 24 小時後，發現 A427 細胞的 BPDE-DNA 鍵結物的含量僅有 0.1 adducts/108 nucleotides，因此推測 A427 細胞的生長不受到 B[a]P 處理的影響，其合成出來的 DNA 將增多，可能使 DNA 鍵結物的含量因而被稀釋掉。由本研究之 Fig. 1 的結果得知 A427 細胞會繼續生長，而 CL-3 細胞的生長則明顯的受到抑制，因此推測 CL-3 細胞會有高含量的 DNA 鍵結物形成，可能和細胞生長速度減慢、DNA 無法正常複製有關。另外本實驗室之前研究證明 CL-3 細胞之 CYP1A1

確實參與 B[a]P 的代謝活化而形成 DNA-adduct，而 CL-3 細胞的 CYP1A1 的表現顯然較 A427 細胞為明顯。這可能是 A427 細胞將 B[a]P 代謝成 BPDE，攻擊 DNA 而產生 BPDE-DNA 鍵結物的能力較 CL-3 細胞來得弱，而導致兩株細胞對 B[a]P 的感受性不同的原因。

CL-3 細胞經 B[a]P 處理之後，細胞會產生高量的 DNA 鍵結物，並使生長受到抑制。因此擬進一步瞭解細胞經 B[a]P 處理之後，為什麼細胞會停止生長？

三、B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞之 p53 和 p21 表現之影響

過去研究已知細胞受到基因毒物傷害時，會誘發 p53 蛋白的堆積 (Kastan et al., 1991; Fritsche et al., 1993)，p53 負責調控細胞週期，當細胞受到損傷時，p53 蛋白會接收細胞受到傷害的訊息，而誘發 p53 蛋白的堆積，細胞週期就會停止在 G1/S 或 G2/M 時期，以使受損的細胞進行修補作用，或走向細胞程序性死亡的路徑 (Levine et al., 1991; Lane et al., 1992)。

以 B[a]P 處理 CL-3 和 A427 兩株細胞 24 小時之後，再將細胞收下，萃取其蛋白以西方墨點法 (Western blot) 來分析 p53 蛋白是否有被 B[a]P 誘導而增高。結果如 Fig. 2 所示，A427 細胞在 10 μ M B[a]P 處理 24 小時之後，A427 細胞的 p53 蛋白量並沒有明顯增加的現象 (Fig. 2)。Caamano et al., (1991) 偵測 A427 細胞本身 p53 蛋白會表現；Ramet et al. (1995) 以 B[a]P 處理 A427 細胞 24 小時後，以細胞免疫染色法偵測 p53 蛋白的表現，結果發現無論是否處理 B[a]P 均僅有 1-5 % 的表現，因此 B[a]P 並不會引起 A427 細胞之 p53 的蛋白量增加。這和本研究之結果相近。因此 B[a]P 處理 A427 細胞，並不會誘發細胞產生 p53 蛋白的堆積，可能是 A427 細胞無法代謝活化 B[a]P 為 BPDE，而造成 DNA 傷害，因此不會促使 p53 蛋白被誘發造成細胞不會停止生長 (Fig. 1)。而 CL-3 細胞在經 10 μ M B[a]P 處理 24 小時之後，其 p53 蛋白確實會被誘發而增高 (Fig. 2)，因此 CL-3 細胞可能會將 B[a]P 代謝形成 BPDE 而形成 DNA 鍵結物。由 Western blot 數據顯示受到 B[a]P 處理之 CL-3 細胞的 p53 蛋白含量比 A427 高出許多，而兩種細胞之 p53 基因均為 wild-type，但 CL-3 細胞的 p53 蛋白卻會被 B[a]P 所誘發而大量表現，可能是細胞之 p53 經 B[a]P 處理之後會在 post-translation 層次，使 p53 的蛋白穩定，而造成 p53 蛋白大量堆積。

推論本身含有 wild-type *p53* 基因的 CL-3 細胞，經 B[a]P 處理之後細胞會有生長停止的現象，且 *p53* 蛋白有被誘發而增高的現象，推測 CL-3 細胞經 B[a]P 處理之後，可能會有 G1 或 G2 arrest 情形發生。*p53* 引起細胞週期停止是經由轉錄活化 *p21^{WAF1/CIP1}* 基因，使 *p21* 蛋白大量表現，進而抑制細胞週期進行所需的 cyclin dependent kinase (CDK) 之活性，使細胞停止在 G1/S 時期，讓受損的細胞能有機會進行 DNA 修復 (Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993)，然而 Munna et al., (1995) 在人類纖維母細胞中發現，G2/M arrest 亦經由 *p53* 去轉錄活化 *p21* 而調控 G2/M arrest。

為了了解被 B[a]P 誘發之 *p53* 是否會誘發 *p21^{WAF1/CIP1}* 的 mRNA 表現，我們以 RT-PCR 來分析 *p21^{WAF1/CIP1}* 的 mRNA 的表現。已知 B[a]P 處理 A427 細胞的 *p53* 蛋白本身並沒有被誘導的情形，由 RT-PCR 的結果也顯示 *p21^{WAF1/CIP1}* mRNA 並沒有隨著 B[a]P 處理濃度增高而改變 (Fig. 3)，這結果印證 A427 細胞處理 B[a]P 後，確實不會誘發 *p53* 蛋白的表現而轉錄活化 *p21^{WAF1/CIP1}* mRNA 功能；然而 CL-3 細胞在 10 μ M 的 B[a]P 處理之下，與未處理的細胞相比，其 *p21^{WAF1/CIP1}* mRNA 確實會增高 (Fig. 3)。因此以 B[a]P 處理 CL-3 細胞會促進 *p53* 蛋白之堆積，而轉錄活化 *p21^{WAF1/CIP1}* mRNA 的表現。

由西方墨點法 (western blot) 分析 *p21* 蛋白表現之結果顯示，A427

細胞在經 10.0 μM 的 B[a]P 處理 24 小時之後，其 p21 蛋白並沒有明顯的增加，所以細胞生長並未停止 (Fig.1)。然而在 CL-3 細胞在經 10.0 μM 的 B[a]P 處理之下，與未處理的細胞相比，其 p21 蛋白，其 p21 蛋白沒有增加，反而有降低的情形。我們推測經由 p53 所轉錄活化的 *p21^{WAF1/CIP1}* mRNA 的轉錄層次雖然和 p53 蛋白的表現一致，但 p21 形成之轉錄後和轉譯層次可能發生改變，而造成 p21 蛋白和 p53 蛋白的表現不一致。p21 蛋白是一種 cyclin dependent kinase inhibitor，會抑制細胞週期的進行，顯然 CL-3 細胞的生長因 B[a]P 而被抑制，可能不是經由 p53 轉錄活化 p21 蛋白，而使細胞停止在 G1 期或 G2 期。

因此進一步以 flow cytometry 分析這兩種細胞在處理 B[a]P 後，在不同時間的細胞週期變化。

四、 B[a]P 對 CL-3 和 A427 細胞週期的影響

已知 10.0 μM 的 B[a]P 處理 CL-3 細胞會使細胞生長受到抑制，而 A427 細胞則不會停止生長。且 CL-3 細胞的 p53 蛋白有被誘發的情形，但其 p21 蛋白卻沒有增加的趨勢。因此以 1.0 和 10.0 μM 之

B[a]P 處理 CL-3 與 A427 兩株細胞，在 0、1、2、4、8、12、24 小時將細胞收下，再以 flow cytometry 偵測細胞週期有何改變？結果如 Fig.5 所示，以 10.0 μ M 的之 B[a]P 處理之後 A427 細胞的細胞週期在 24 小時內之分佈與沒有 B[a]P 處理之細胞一樣，在 G1、S、和 G2/M 期幾乎沒有都沒有差異。

然而在 CL-3 細胞方面，在 10.0 μ M 的 B[a]P 處理之 CL-3 細胞和沒有處理 B[a]P 的細胞，在 G1 期沒有明顯的差異，但在 S 期和 G2/M 期則都有改變，經 B[a]P 處理之細胞的 S 期細胞數會明顯降低，但是 G2/M 期的細胞則會大量增加 (Fig. 6)。

雖然處理高濃度 10.0 μ M B[a]P 的 CL-3 細胞在 24 小時後 G1 期的分佈與沒有處理的細胞沒有差異(Fig.6)，但經 B[a]P 處理之後的 CL-3 細胞的 p53 蛋白的表現有被誘發而增高的情形(Fig.2)，我們便推測台灣肺腺癌 CL-3 細胞經高濃度 10.0 μ M B[a]P 處理之後，p53 被誘發而增高似乎不會造成 G1 arrest。Cyrus et al. (1997) 發現細胞以 B[a]P 處理會發生 G1 arrest 的現象，但經 AhR 阻斷劑 α -naphthoflavon 抑制 AhR 的表現，再以 B[a]P 處理，則細胞不會有 G1 arrest 的現象。若將 B[a]P 處理表現 mutant p53 之 3T3 細胞或 p53 -/- 之小白鼠之纖維母細胞，則會引起 G1 arrest。因此 3T3 細胞的 G1 arrest 不是經由 p53 調控的 (p53 independent)。雖然已知 CL-3 細胞亦含有 AhR

(Chang, master thesis, 1998)，經 B[a]P 處理之 CL-3 細胞其 p53 蛋白的表現比未處理的細胞高(Fig.2)，但是 G1 期的表現卻沒有差異的現象。這個結果顯示 B[a]P 誘發肺腺癌 CL-3 細胞 p53 蛋白大量表現，卻未造成細胞 G1 arrest。

CL-3 細胞的 S 時期在經 10.0 μ M B[a]P 處理之下，S 期細胞數在 1 小時之後即明顯下降的情形 (由原來的 65.7%降至 15.2%)，至 4 小時降到最低 (7.4%)，可是在 24 小時時，其 S 期細胞數又回復至與對照組相同的含量，這顯示 DNA 合成在短時間有被抑制的現象，這結果更印証高含量的 BPDE-DNA adduct 的可能是與 DNA 合成受阻所導致。

在 G2+M 期，10 μ M 的 B[a]P 會促使 G2+M 期在 1 小時之後開始增加 (由原來的 3.5% 增高至 64.9%)，但在 2 與 4 小時其 G2+M 期的細胞數則增到最高 (72.7-72.4%)，而在 8 小時後卻又開始降低。Lee et al. (1995) 研究發現細胞經 DNA 傷害會停留在 G1 期，細胞若是停留在 G2+M 期則是細胞為了避免受損的 DNA 或不完整的 DNA 進行細胞分裂，而產生受損的子細胞。

過去研究發現以基因毒物處理細胞，會使細胞週期停止在 G2/M 期，在含有 wild-type p53 或 mutant type p53 基因的細胞皆會發生，然

而含有 wild-type *p53* 基因之細胞，經基因毒物處理後所產生的 G2/M arrest 是經由 *p53* 蛋白所誘發。所以本身含有 wild-type *p53* 的台灣肺腺癌 CL-3 細胞，經 B[a]P 處理之後所產生的 G2/M arrest 是否經由 *p53* 蛋白所誘發？則有待下面的研究。

五、CL-3 細胞之細胞週期調控蛋白在細胞週期中扮演的角色

欲瞭解 CL-3 細胞在高濃度 10.0 μM 之 B[a]P 處理 0-24 小時之間，調控細胞週期相關蛋白，包括 *p53* 及其下游 *p21*、MDM2 蛋白在細胞週期間的變化和細胞週期間的相關性。將 CL-3 細胞以 10.0 μM 之 B[a]P 處理，分別在 0、1、2、4、8、12、24 小時後將細胞收下，萃取其蛋白，以西方墨點法 (Western blot) 分析其蛋白含量的變化。結果如 Fig. 7 所示，發現 *p53* 蛋白量在 B[a]P 的處理之下，24 之內並沒有明顯的變化，因此推測所產生的 G2+M phase arrest，與 *p53* 沒有明顯的相關性，過去研究發現經基因毒物處理所產生的 G2 arrest，在老鼠和人類細胞中均缺乏 *p53* 或 *p21* 之下亦會產生 (Deng et al., 1995; Brugarolas et al., 1995; Waldman et al., 1995; Jeremy et al., 1997)，而造成這個 G2 arrest 是在缺乏 *p53* 及 *p21* 蛋白的情況下，推測是細胞經由活化一種 protein kinase Chk1，磷酸化的 Chk1 會抑制

Cdc25C 的蛋白去磷酸化酶的功能，而抑制 Cdc25C 會使細胞週期中進入 M 期所需的 Cdc2 無法去磷酸化，因 Cdc2 失去功能，而使細胞停止在 G2 期。

然而，Bunz et al. (1998) 發現細胞經基因毒物處理之後，會有 G2/M phase arrest 增加的現象，且 p53 及 p21 蛋白會促進 G2+M phase arrest 增加，而含有 wild-type p53 gene 的細胞 G2/M phase arrest 增加是經由 p53 蛋白表現增加而造成，但是本實驗結果卻不同，含有 wild-type p53 基因的台灣肺腺癌 CL-3 細胞，在處理 B[a]P 後會有 G2+M phase arrest 的現象，且 p53 蛋白的表現似乎並未參與 G2+M phase arrest (Fig.7)，雖然 p53 具有轉錄活化 *p21WAF1/CIP1* 基因的功能，但 p21 蛋白又沒有被誘導而增加，如 Fig. 8 所示，p21 蛋白的表現並未隨 p53 蛋白量的變化而有明顯的改變，這結果更顯示含有 wild-type p53 的台灣肺腺癌 CL-3 細胞，p53 蛋白並不參與經 B[a]P 所造成的 G2+M phase arrest。

另外在 MDM2 蛋白的表現方面，經 B[a]P 處理的細胞在 24 小時內的變化，如 Fig. 9 所示，MDM2 蛋白的變化與 p53 蛋白的表現似乎有一致性；已知 MDM2 是一種致癌蛋白 (Cahilly-Snyder et al., 1987)，當 p53 蛋白大量表現時會轉錄活化 MDM2 蛋白的表現，又 MDM2 蛋白的大量表現會回饋抑制 p53 的功能 (Momand et al., 1992; Oliner et al.,

1993; Chen et al., 1994; Michael et al., 1997; Ygal et al., 1997; AR Hall et al., 1997), 這個結果顯示台灣肺腺癌 CL-3 細胞之 p53 蛋白可能被 MDM2 蛋白抑制其功能, 而使細胞經基因毒物處理之後, 無法執行正常 G1 arrest 與 G2 arrest 的原因。

已知 p21 蛋白會與 proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) 結合進而抑制 PCNA 的功能 (Rong et al., 1994; Rene et al., 1998), PCNA 為細胞 DNA 進行複製所必須的蛋白, 又 PCNA 的表現如 Fig. 11 所示, 其在 4 小時之前幾乎不表現, 但在 B[a]P 處理 8 小時之後, PCNA 表現有明顯的增加的現象, 雖然 PCNA 的表現有被抑制的情形, 但 p21 蛋白的表現量雖然很低, 但其變化可能參與抑制 PCNA 的表現, 因此 S 期有明顯被抑制的現象。又 Willian et al., (1999) 當 DNA 合成受到抑制時, p53 蛋白的表現會防止細胞週期進入 M 期。

已知 cyclin B1 為細胞週期 G2+M phase 的調控蛋白 (Randall et al., 1994; Pei et al., 1998; Jonathan et al., 1999); Steven et al. (1999) 發現 G2 arrest 的發生是經由 p53 蛋白將 cyclin B1 抑制所導致; 所以為了印証經 10.0 μ M B[a]P 處理之 CL-3 細胞, 確實有 G2+M phase arrest, 所以進一步偵測 cyclin B1 蛋白的表現。結果如 Fig. 10 所示, 經 10.0 μ M B[a]P 處理之 CL-3 細胞, cyclin B1 的表現由 4 小時後才開始表現, 而 G2+M phase 的表現在 4 小到達最高的比例, 但在 8 小

時後卻又下降，顯示 cyclin B1 的變化與 G2 arrest 似乎有一致性，然而 p53 蛋白的表現在 24 小時之間並沒有變化；Winters et al., (1998) 發現，在缺乏 *p53* 基因的人類細胞 H1299，經 γ -radiation 所導致的 G2 arrest 是經由細胞本身抑制 Cdc2 與 cyclin B1 的磷酸化，而使細胞無法由 G2 期進入 M 期。因此推測 B[a]P 處理台灣肺腺癌 CL-3 細胞所造成之細胞週期變化可能 p53 未直接參與 G2/M arrest，而是細胞本身直接降解 cyclin B1 而造成細胞 G2/M arrest。

由以上結果可知，B[a]P 所導致含有 wild-type *p53* 之台灣肺腺癌細胞 CL-3 之細胞週期產生 G2/M arrest 的現象，是經由 p53-independent pathway。

陸、 參考文獻

陳兆平 Chen CP (1996) Analysis of the aromatic DNA adducts in lung tissues from lung cancer patients in Taiwan and effect of 17- β estradiol on the benzo[a]pyrene-DNA adduct levels in CL-3 lung adenocarcinoma cell line. Master Thesis, Institute of Biochemistry, Chung Shan Medical and Dental College.

張剛璋 Chang KW (1998) The toxicity of environment carcinogen-benzo[a]pyrene and Cooking oil fume in lung cell lines (CL-3, MRC-5 and A427) Master Thesis, Institute of Toxicology, Chung Shan Medical and Dental College.

Andrei L Gartel and Angela L. Tyner (1999) Transcriptional regulation of the p21WAF1/CIP1 gene. *Experimental Cell Research*, 246, 280-289

Angerer J. , Mannschreck C., Gundel J. (1997) Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 70, 365-377

Arnold J. Levine (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division.
Cell, 88, 323-331

Atsushi Shimizu, Jun-ichi Nishida, Yousuke Ueoka, Kiyoko Kato, Toshirou Hachiya, Yumiko Kuriaki, and Norio Wake (1998) Cyclin G contributes to G2/M arrest of cells in response to DNA damage. Biochemical and Biophysical Research Communications 242, 529-533

Ben van Aagen, Ivo M. Maas, Ivo H. Zwingmann, Frederik-Jan Van Schooten, and Jos C. S. Kleinjans (1997) B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung transformation. Environmental and Molecular Mutagenesis 30: 287-292

Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science, 282, 1497-1501

Caamano J, B. Ruggeri, S. Momiki, A. Sickler, S. Y. Zhang, and A. J. P. Klein-Szanto (1991) Detection of p53 in primary lung tumors and nonsmall cell lung carcinoma cell lines. American Journal of Pathologists 139, 4, 839-845

Charles J. Sherr (1994) G1 phase progression cyclin on cue. *Cell*, 79, 551-555

Charles J. Sherr (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-1677

Chen ,Chaw-Yuan., Jonathan D. Oliner, Qimin Zhan, Albert J. Fornace, JR. Bert Vogelstein, and Michael B. Kastan (1994) Interactions between p53 and MDM2 in a mamalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc. Natl. Acad. USA*, 91, 2684-2688

Clasen S, Schulz WA, Gerharz C-D, Grimm M-O, Christoph F and Schmitz-Drager BJ (1998) Frequent and heterogenous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. *British Journal of Cancer* 77(4), 515-521

Cyrus Vaziri and Douglas V. Faller (1997) A Benzo[a]pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53-independent G1 arrest in 3T3 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 2762-2769

Daisaku Arita, mariko Kambe, Chikashi Ishioka and Ryunosuke Kanamaru (1997) Induction of p53-independent apoptosis associated with G2/M arrest following DNA damage in human colon cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 39-43

Douglas S. Hawkins, G. William Demers, and Denise A. Galloway (1996)
Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple
chemotherapeutic agents. *Cancer Research* 56, 892-898

Dov Schwartz, Nava Almog, Amnon Peled, Naomi Goldfinger and Varda
Rotter (1997) Role of wild type p53 in the G2 phase : regulation of
the γ -irradiation induced delay and DNA repair. *Oncogene*, 15,
2597-2607

El-Deiry, Wafik S. Takashi Tokino, Victor E. Velculescu, Daniel B. Levy,
Ramon Parsons, Jeffrey M. Trent, David Lin, W. Edward Mercer,
Kenneth W. Kinzler, and Bert Vogelstein (1993) WAF1, a
potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825

Faina Vikhanskaya, Eugenio Erba, Maurizio D'Incalci, and Massimo
Broggini (1996) Change in cyclins and cyclin-dependent kinases
induced by DNA damaging agents in a human Ovarian cancer cell
line expressing mutated or wild-type p53. *Experimental Cell
Research*, 227, 380-385

Flowers-Geary, L., Harvey, R. G. and Penning, T. M. (1995) Identification of benzo[a]pyrene-7,8-dione as an authentic metabolite of (\pm)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 16, 2707-2715.

Fritsche Micael, Christel Haessler & Gerhard Brandner (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damage agents. *Oncogene*, 8, 307-318

Gerd P. Pfeifer and Mikhail F. Denissenko (1998) Formation and repair of DNA lesions in the p53 gene relation to cancer mutation? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31, 197-205

Hall A R and Milner Jo (1997) Specific p53-DNA complexes contain an mdm2-related protein. *Oncogene* 14, 1371-1376

Harper, J. Wade., Guy R. Adami, Nan Wei, Khandan Keyomarsi, and Stephen L. Elledge (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816

James Brugarolas, Chitra Chandrasekaran, Jeffrey I. Gordon, David Beach, Tyler Jacks & Gregory J. Hannon (1995) Radiation- induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 377, 552-557

Jeremy P. Brown, Wenyi Wei, John M. Sedivy (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277, 831-934

Jocelyn Ceraline, Gael Deplanque, Brigitte Duclos, Jean-Marc Limacher, Amor Hajri, Francine Nole, Christophe Orvain, Thierry rebour, Claudine Klein-Soyer and Jean-pierre Bergerat (1998) Inactivation of p53 in normal human cells increase G2/M arrest and sensitivity +to DNA-damaging agents. *International Journal of Cancer*, 75, 432-438

Jonathan D. Moore, Jing Yang, Ray Truant, and Sally Korbluth (1999) Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of cdk2/cyclin E and cdc2/cyclinB1. *The Journal of Cell Biology*, 144, 213-224

Jonathan M. Lee and Alan Bernstein (1993) p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5742-5746

Jun Yang and Penelope Duerksen-Hughes (1998) A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis*, 19, 1117-1125

Karen A. Heichman and James M. Roberts (1994) Rules to replicate by. *Cell*, 79, 557-562

Karin Butz, Caroline Geisen, Angela Ullmann, Hanswalter Zentgraf and Felix Hoppe-Seyler (1998) Uncoupling of p21WAF1/CIP1/SDI1 mRNA and protein expression upon genotoxic stress. *Oncogene*, 17, 781-787

Kastan Michael B., Onyinye Onyekwere, David Sidranaky, Bert Vogelstein, and Ruth W. Craig. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research*, 51, 6304-6311.

Lane, D.P. (1992) *Nature*, 358, 15-16.

Laura Sepp-Lorenzino and Neal Rosen (1998) A farnesyl-protein transferase inhibitor induces p21 expression and G1 block in p53 wild type tumor cells. (1998) *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 32, 20243-20251

Lee, H., Larner, J. M., and Hamlin, J. L. (1997) A p53-independent damage sensing mechanism that function as a checkpoint at the G1/S transition in Chinese Hamster Ovary Cells. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 94, 526-531

Lee, Huei ., Wang, Lee., Shih, Jung-Feng, (1995) Mutagenicity of particulates from the laboratory combustion of plastics. Mutation Research 364, 135-144

Levine, A.J., Momand, J. & Finlay, C.A. (1991). Nature, 351, 453-456.

Lin D M., Mercer E, Kinzler K W and Vogelstein B. (1993), Cell, 75, 817-825

Magali Oliver, Siliva Bautista, Helene Valles, and Charles Theillet (1998) Relaxed cell cycle arrest and propagation of unrepaired chromosomal damage in cancer cell lines with wild-type p53. Molecular Carcinogenesis 23, 1-12

Maria Donner E. and Julian Preston R. (1996) The relationship between p53 status, DNA repair and chromatid aberration induction in G2 mouse embryo fibroblast cells treated with bleomycin. Carcinogenesis 17, 1161-1165

Michael H. G. Kubbutat, Stephen N. Jones & Karen H. Vousden (1997)
Regulation of p53 stability by MDM2. *Nature*, 387, 299-303

Michael R. A. Mowat (1998) p53 in tumor progression : life, death, and
everything. *Advance in Cancer Research*, 25-48

Michelle Collister, David P. Lane and Bonnie L. Kuehl (1999) Differential
expression of p53, p21WAF1/CIP1 and hdm2 dependent on DNA
damage in Bloom's syndrome fibroblastr. *Carcinogenesis* , 19,
2115-2120

Mikhail V. Blagosklonny, Gen Sheng Wu, Satoshi Omura, and Wafik S.
EL-Deiry (1996) Proteasome-dependent regulation of
p21WAF1/CIP1 expression. *Biochemical And Biophysical
Communications* 227, 564-569

Moon-shong Tang, Annie Pao, and Xu-shiao Zhang (1994) Repair of
Benzo[a]pyrene diol epoxide- and UV-induced DNA damage in
dihydrofolate reductase and adenine phosphiribisyltransferase
genes of CHO cells. *The Journal of Biological Chenistry* 17,
12749-12754

Munna L. Agarwal, Archana Agarwal, William R, and George R. Stark
(1995) p53 control both the G2/M and G1 cell cycle checkpoints
and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts, Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 92, 8493-8497

Natalia S. Pellegata, Ronald J. Antoniono, J. Leslie Redpath, and Eric J.
Stanbridge (1996) DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest:
A reevaluation. Proc. Natl, Acad. Sci. USA. 93, 15209- 15214

Notterman D, Young S, Wainger B and Levine AJ (1998) Prevention of
mammalian DNA reduplication, following the release from the
mitotic spindle checkpoint, requires p53 protein, but not p53-
mediated transcriptional activity. Oncogene, 17, 2743-2751

Nywana Sizemore, hasan Mukhtar, Letha H. Couch, Paul C. Howard and
Ellen A. Rorke (1995) Differential response of normal and HPV
immortalized ectocervical epithelial cells to B[a]P. Carcinogenesis
16, 2413-2418

Patricia M. Flatt, James O. Price, Amy Shaw, and Jennifer A. Pietenpol
(1998) Differential cell cycle checkpoint response in normal
human keratinocytes and fibroblasts. Cell Growth &
Differentiation, 9, 535-543

Paul Nurse (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 79, 547-550

Paul Nurse (1997) Checkpoint pathways come of age. *Cell*, 91, 865-867

Pei Jin, Stephen Hardy, and David O. Morgan (1998) Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *The Journal of Cell Biology* 141, 875-885

Plumb R. Jane A. Milroy and S.B. Kaye (1989) Effects of the pH dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan absorption on chemosensitivity determined by novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research* 49, 4435-4440

Qasim A. Khan, Karen H. Vousden and Anthony Dipple (1997) Cellular response to DNA damage from a potent carcinogen involves stabilization of p53 without induction of p21WAF1/CIP1. *Carcinogenesis*, 18, 2312-2318

Randall W. King, Peter K. Jackson, and Marc W. Kirschner (1994) Mitosis in transition. *Cell*, 79, 563-571

Ramet, Mika., Katariina Castren, Kaisu Jarvinen, Katja Pekkala, Taina Turpeenniemi-Hujanen, Ylermi Soini, Paavo and Kirsi Vahakangas (1995) p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 16, 2117-2124

Rene H Medema, Rob Klompmaker, Veronique AJ Smits and Gert Rijksen (1998) p21WAF1 can block cells at two point in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene*, 16, 431-441

Richard A. Woo, Kevin G. McLure, Susan P. Lees-Miller, Derrick E. Rancourt & Patrick W. K. Lee (1998) DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*, 394, 700-704

Rong LI, Shou Waga, Gregory J. Hannon, David beach & Bruce Stillman (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 371, 534-537

Ruth A. Barratt, Gary kao, W. Gillies McKenna, Jian Kuang, and J. Muschel (1998) The G2 block induced by DNA damage : A caffeine-resistant component independent of Cdc25C, MOM-2 phosphorylation, and H1 kinase activity. *Cancer Research* , 58, 2639-2645

Sally A Amundson, Timothy G Myers and Albert J Fornace Jr (1998) Role for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17, 3287-3299

Shunsuke Kagawa, Toshiyoshi Fujiwara, Akio Hizuta, Tatsuji Yasuda, Wei-Wei Zhang, Jack A Roth and Noriaki Tanaka (1997) p53 expression overcomes p21WAF1/CIP1-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 15, 1903-1909

Stacey L. Tannheimer, Stephen P. Ethier, Kevin K. Caldwell and Scott W. Burchiel (1998) Benzo[a]pyrene- and TCDD-induced alterations in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line. *Carcinogenesis* 19, 1291-1297

Steven A. Innocente, John L.A. Abrahamson, John P. Cogswell, and Jonathan M. Lee (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2147-2152

Sundaresan Venkatachalam, Mikhail Denissenko and Altaf A. Wani (1995) DNA repair in human cells : quantitative assessment of bulky anti-BPDE-DNA adducts by non-competitive immunoassays. Carcinogenesis 16, 2029-2036

Ted Weinert (1997) A DNA damage checkpoint the cell cycle engine. Science 277, 1450-1451

Teresa A. Lehman, William p. Bennett, Robert A. Metcalf, Judith A. Welsh, Jill Ecker, Rama V. Modali, Stephaen Ullrich, joseph W. Romano, Ettore Appella, Joseph R. testa, Brenda I. Gerwin, and Curtis C. harris. (1991) p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. Cancer Research, 51, 4090-4096

Terhi Tapiainen, Kaisu Jarvinen, Paavo Paakko, Nina Bjelogrljic and Kirsi Vahakangas (1996) TPA decreases the p53 response to benzo[a]pyrene-DNA adducts in vivo in mouse skin. Carcinogenesis 17, 1377-1380

Tony Hunter and Jonathon Pines (1994) Cyclin and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 79, 573-582

Waldman, Kenneth W. Kinzler, and Bert Vogelstein (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research* 55, 5187-5190

Weyand, E.H. and Bevan, D.R. (1986) Benzo[a]pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Res.* 46, 5655-5661

Winter ZE, WM Ongkeko, AL Harris and CJ Norbury (1998) p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene*, 17, 673-684

William R Taylor, Munna L Agrwal, Archana Agarwal, Dennis W Stacey and George R Stark (1999) p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene*, 18, 283-295

Wolterbeek P. M., Roggeband R., Baan R. A., Feron V. J. and L. Rutten A. A. J J. (1995) Relation between benzo[a]pyrene-DNA adducts, cell proliferation and p53 expression in tracheal epithelium of hamsters fed a high β -carotene diet. *Carcinogenesis* 16, 1617-1622

Won G. An, Yutaka Chuman, Tito Fojo, and Mikhail V. Blagosklonny (1998) Inhibitors of transcription, proteasom inhibitors, and DNA-damaging drugs differentially affect feedback of p53 degradation. *Experiment Cell Research* 244, 54-60

Ygal Haupt, Ruth Maya, Anat Kazaz & Moshe Oren (1997) MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296-299

Yi Ding, Yoshizumi Matsukawa, Naoko Ohtani-Fujita, Daishiro Kato, Su Dao, Takaaki Fujii, Yuji Naito, Toshikawa, Toshiyuki Sakai and Gerald A. Rosenthal (1999) Growth inhibition of A549 human lung adenocarcinoma cells by L-Canavanine is associated with p21/WAF1 induction. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 69-74

Zhiyong Han, Devasis Chatterjee, Dong Ming He, Janet Early, Panayotis Pantazis, James H. Wyche, and Eric A. Hendrickson (1995)
Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis
induction by X-irradiation. *Molecular and Cellular Biology*, 15,
5849-5857

Zoe A. Stewart, Steven D. Leach, and Jennifer A. Pietsenpol (1999)
p21WAF1/CIP1 inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents
endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Molecular and
Cellular Biology* 19, 1, 205-215

Table 1. Cytotoxicity of Benzo[a]pyrene in CL-3 and A427 cell lines by MTT assay.

Cell line	B[a]P (μM)	Survival (%)
CL-3		
	0	100
	1.0	97.95\pm2.3
	10.0	96.85\pm7.54
A427		
	0	100
	1.0	94.95\pm2.51
	10.0	101.84\pm3.15

Survival % = (The absorbance of treatment of sample - the absorbance of medium) / (the absorbance of DMSO control - the absorbance of medium) \times 100

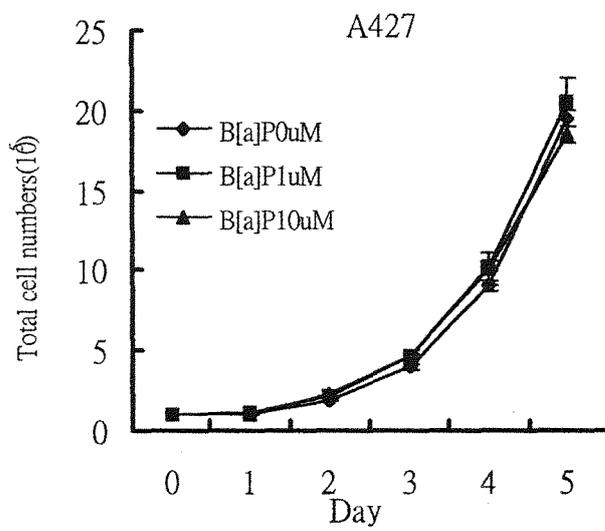
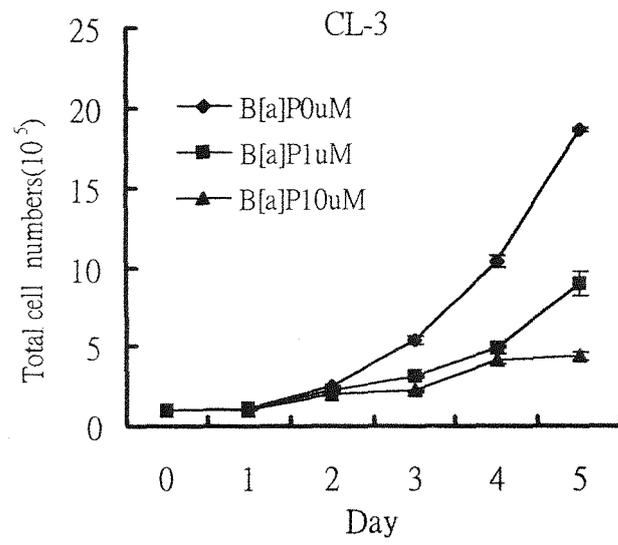


Fig.1. Effect of B[a]P on cell growth of human lung adenocarcinoma CL-3 and A427 cell lines during five days.

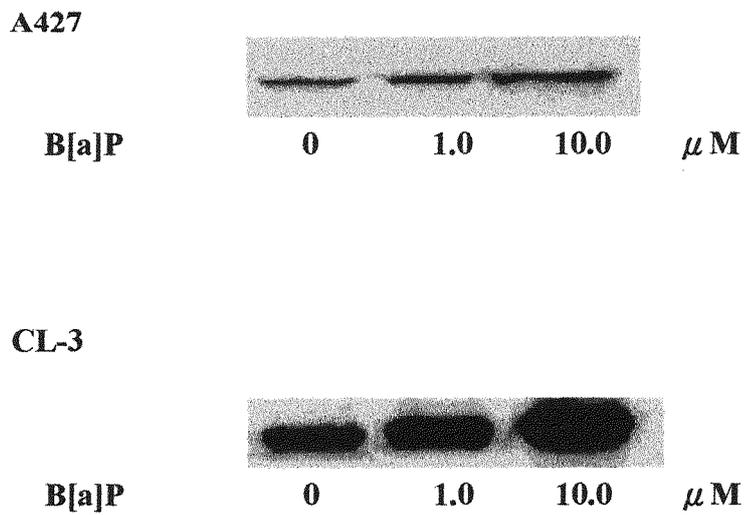


Fig. 2. Western blot of p53 protein expression of CL-3 and A427 cells after treatment with different concentrations of B[a]P for 24 hours.

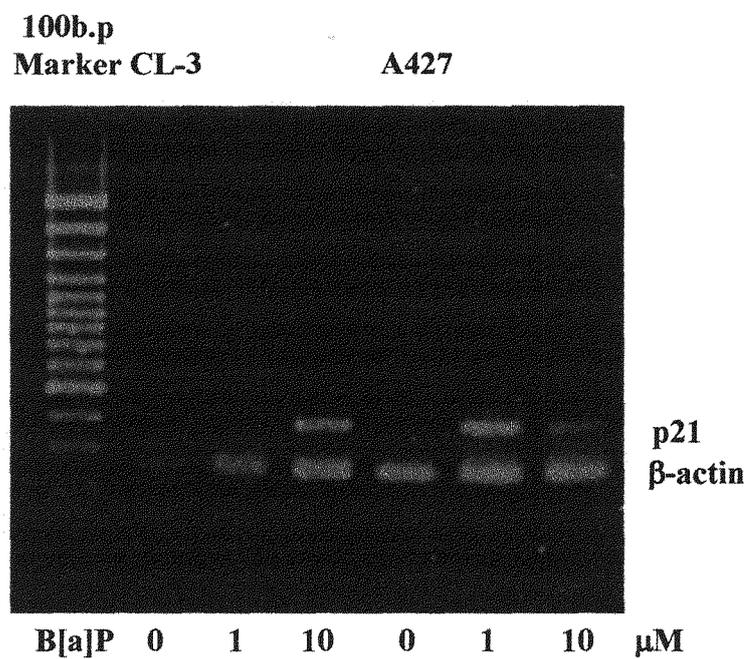


Fig.3. RT-PCR of p21 mRNA expression in A427 and CL-3 cells after B[a]P treatment 24 hour .

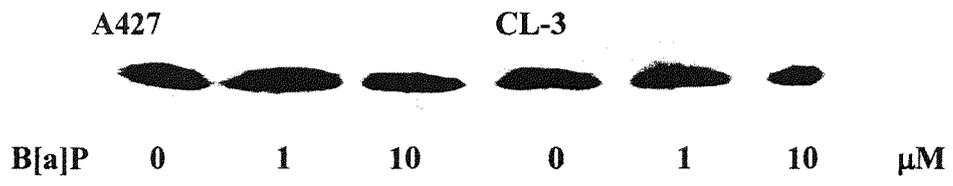
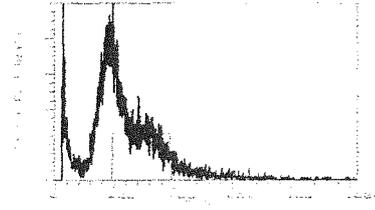
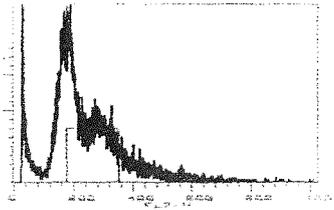


Fig.4. Western blot of p21 protein expression in A427 and CL-3 cells after B[a]P treatment for 24 hours.

B[a]P 0 μ M

B[a]P 10.0 μ M

0hr



G1:40.5%

G1:46.1%

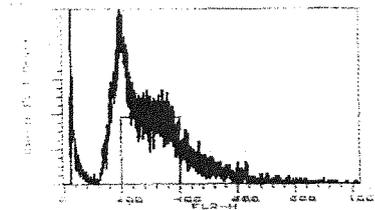
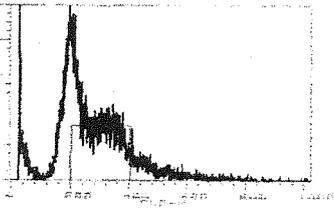
S:49.0%

S:52.7%

G2+M:10.5%

G2+M:1.2%

1hr



G1:36.8%

G1:32.5%

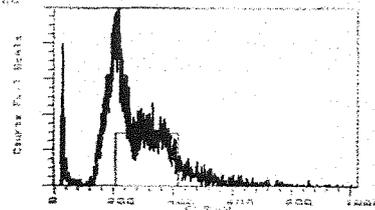
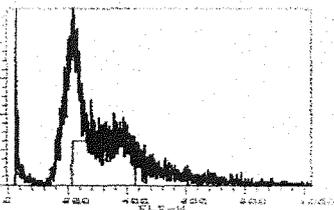
S:57.0%

S:60.2%

G2+M:6.2%

G2+M:7.3%

2hr



G1:38.8%

G1:38.6%

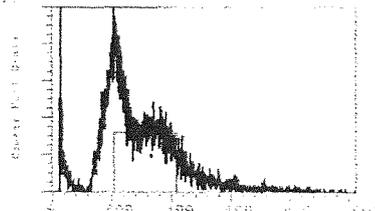
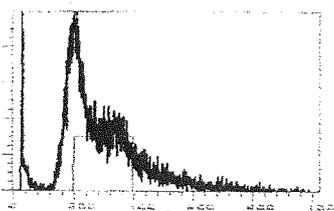
S:52.5%

S:59.1%

G2+M:8.7%

G2+M:2.3%

4hr



G1:38.1%

G1:31.8%

S:49.8%

S:62.0%

G2+M:12.1%

G2+M:6.2%

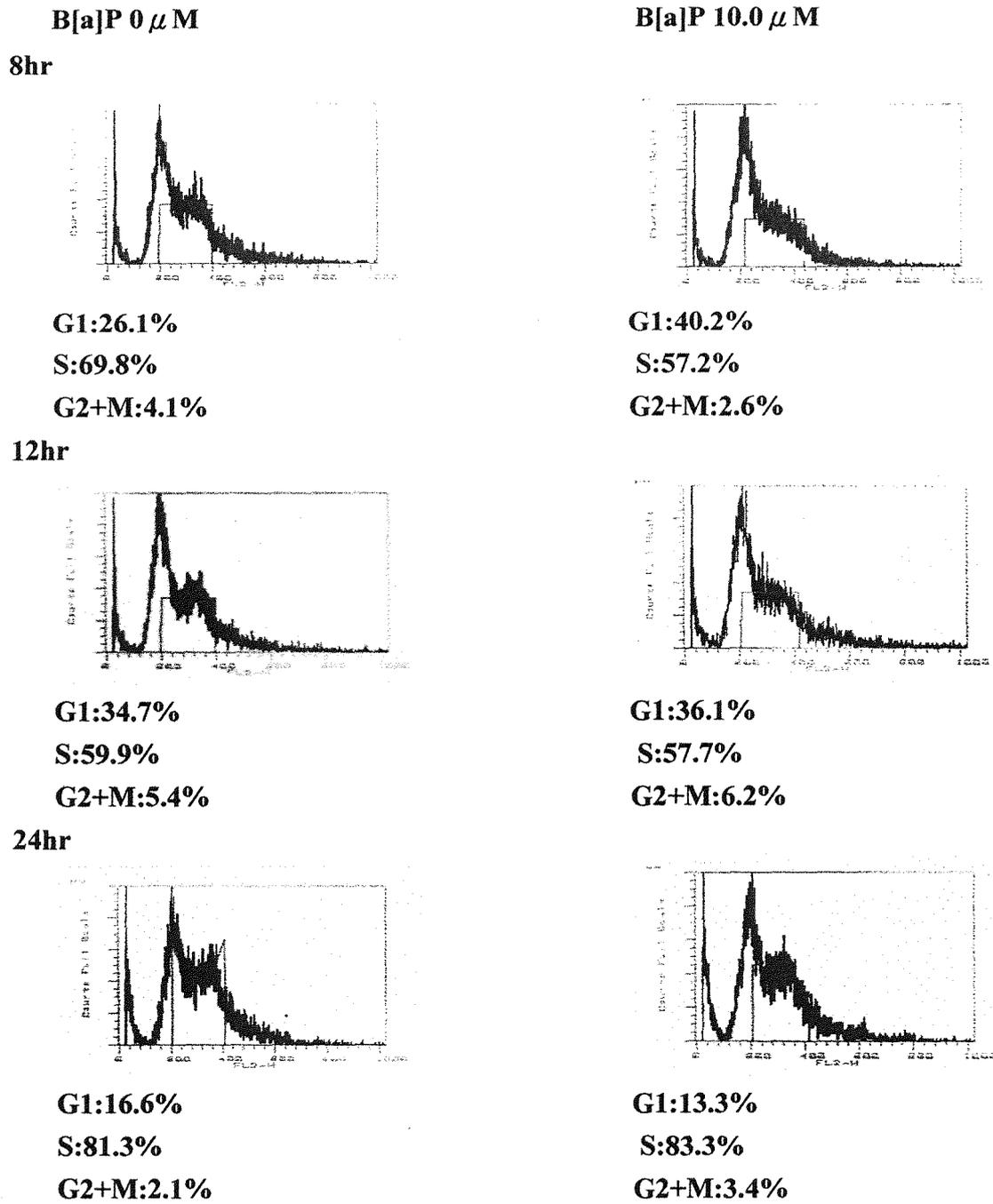


Fig.5. Comparison of cell cycle phase distribution of A427 cells treated with or without B[a]P. A427 cells were grown in 60mm dish in presence (10 μ M) or absence of B[a]P (0 μ M) for indicated time course. Cell cycle phase was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining.

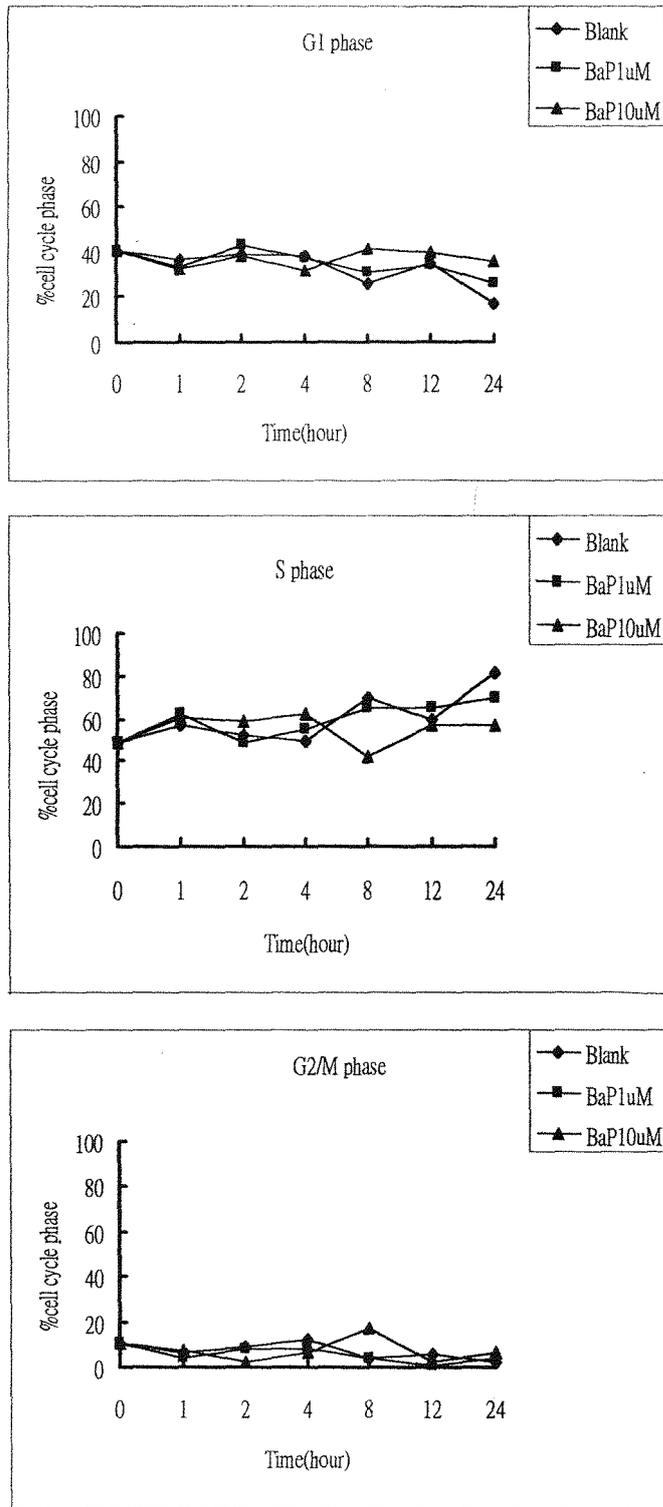
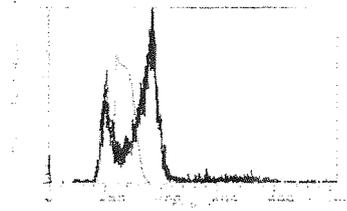
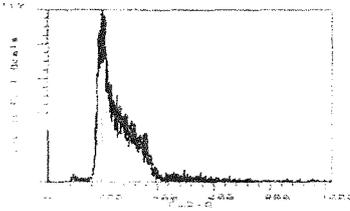


Fig.5-1. Comparison of cell cycle phases distribution of A427 cells treated with or without B[a]P. Cells were grown in 60 mm dish in presence (1-10 μ M) or absence of B[a]P for the indicated time. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining.

B[a]P 0 μ M

B[a]P 10.0 μ M

0hr



G1:30.9%

G1:21.3%

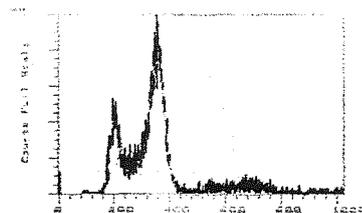
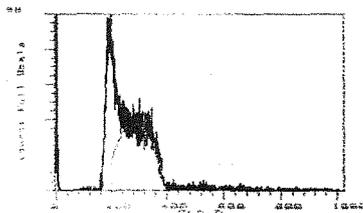
S : 65.7%

S :57.6%

G2+M:3.5%

G2+M:21.1%

1hr



G1:36.0%

G1:19.9%

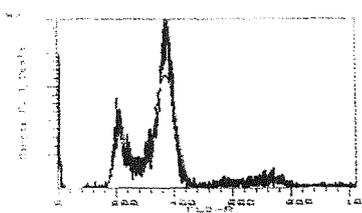
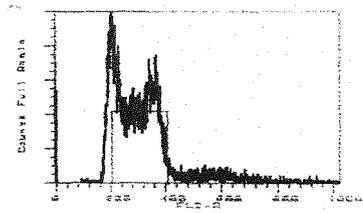
S : 59.1%

S :15.2%

G2+M:4.9%

G2+M:64.9%

2hr



G1:23.0%

G1:13.6%

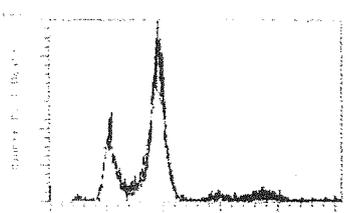
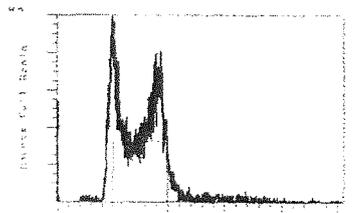
S : 72.3%

S :13.7%

G2+M:4.7%

G2+M:72.7%

4hr



G1:22.5%

G1:20.2%

S : 58.3%

S :7.4%

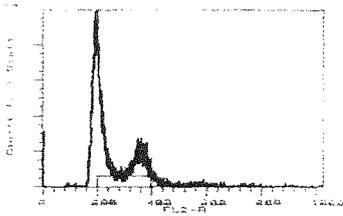
G2+M:19.2%

G2+M:72.4%

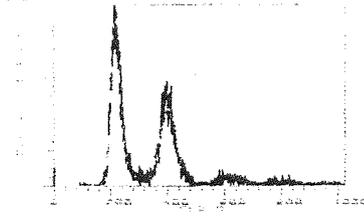
B[a]P 0 μ M

B[a]P 10.0 μ M

8hr

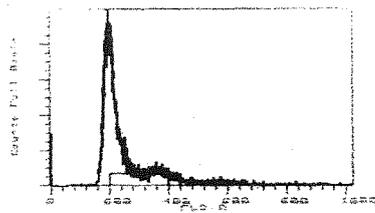


G1:59.5%
S : 22.9%
G2+M:17.6%

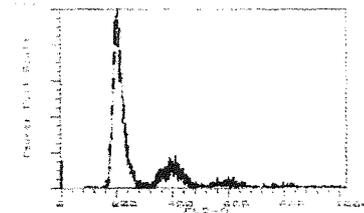


G1:44.9%
S :11.3%
G2+M:43.8%

12hr

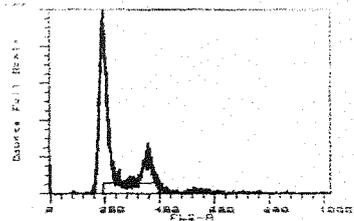


G1:70.1%
S : 22.7%
G2+M:7.2%

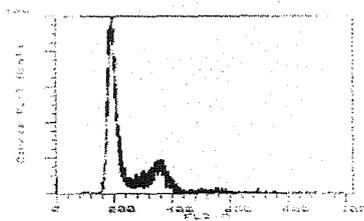


G1:63.0%
S :18.8%
G2+M:18.2%

24hr



G1:61.6%
S : 25.7%
G2+M:13.1%



G1:59.1%
S :25.5%
G2+M:15.4%

Fig.6. Comparison of cell cycle phase distribution of CL-3 cells treated with or without B[a]P. CL-3 cells were grown in 60 mm dish in presence (10 μ M) or absence of B[a]P (0 μ M) for indicated time course. Cell cycle phase was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining.

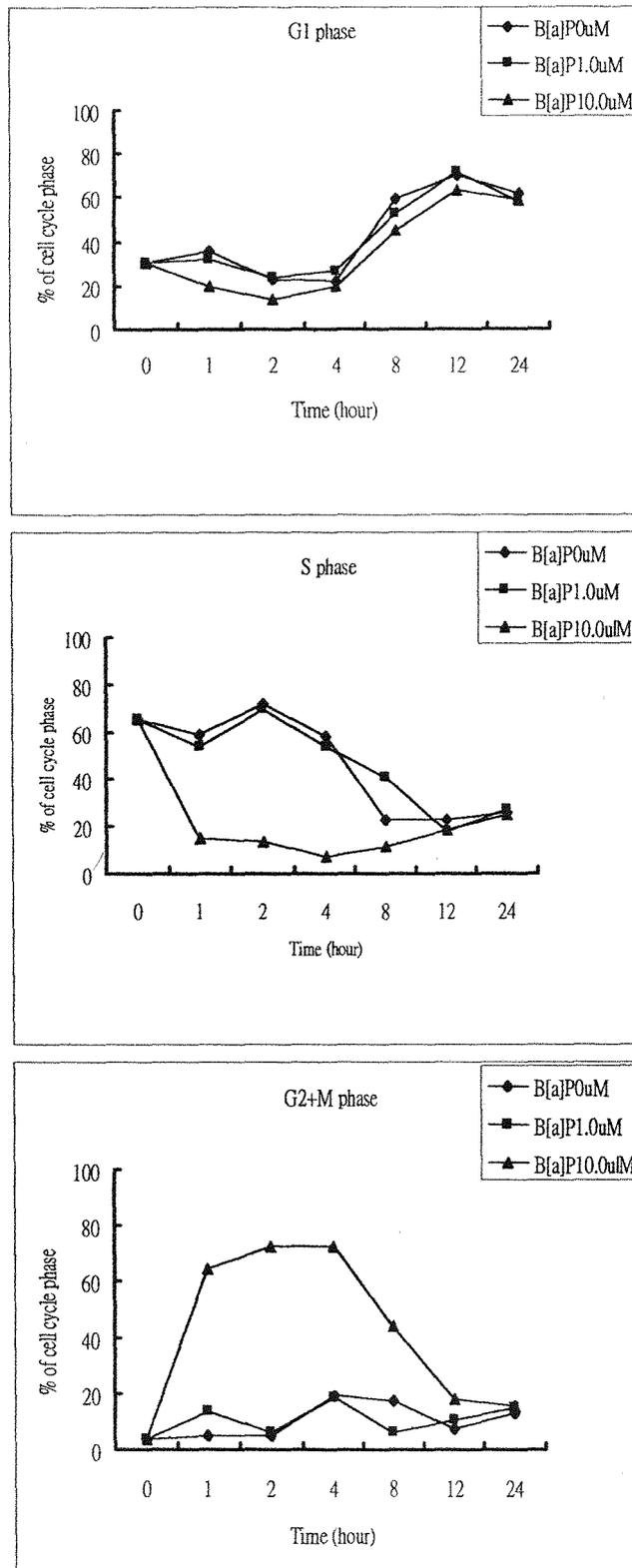


Fig.6-1. Comparison of cell cycle phases distribution of CL-3 cells treated with or without B[a]P. CL-3 cells were grown in 60 mm dish in presence (1-10 μ M) or absence of B[a]P for the indicated time. Cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining.

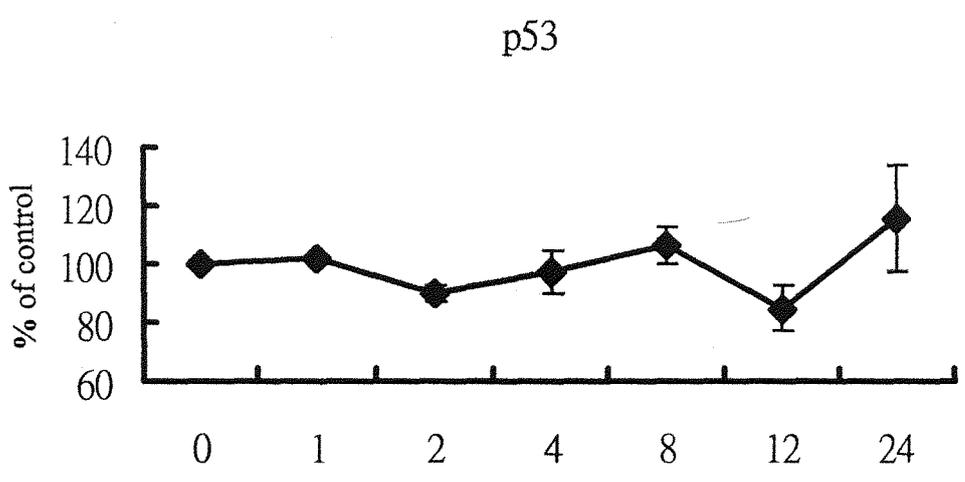
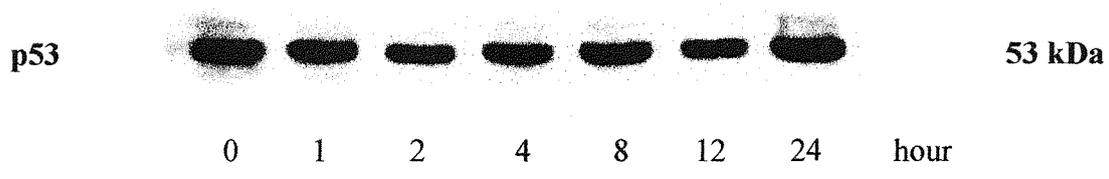


Fig.7. Western blot of p53 protein expression in CL-3 cell line after 10μM B[a]P treatment for indicated times.

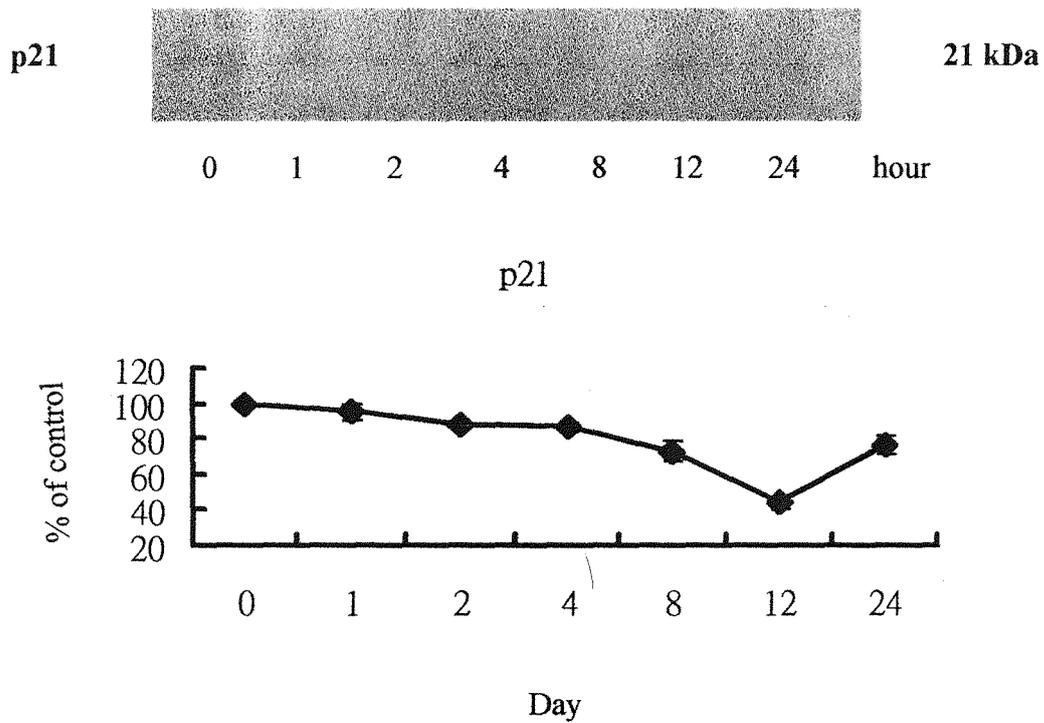


Fig.8. Western blot of p21 protein expression in CL-3 cell line after 10µM B[a]P treatment for indicated times.

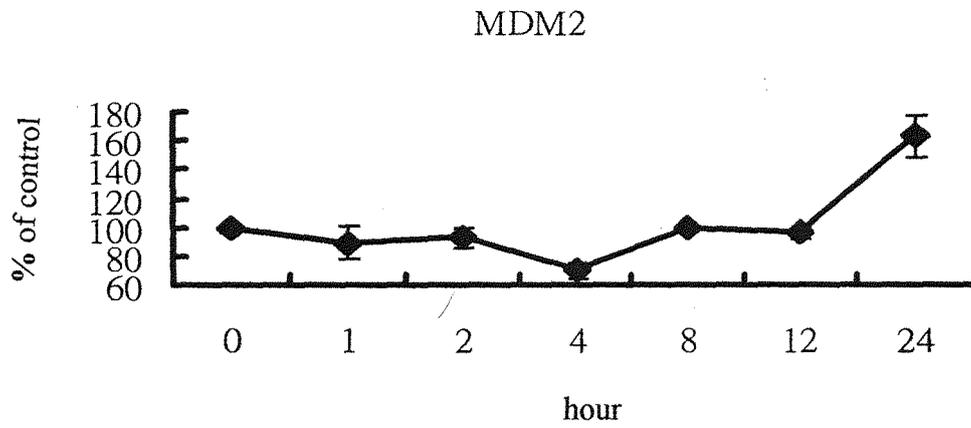
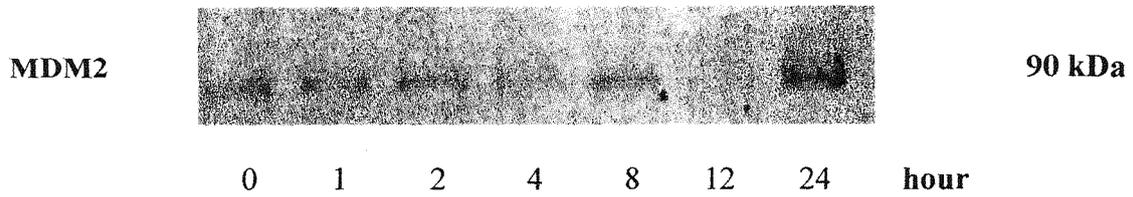


Fig.9. Western blot MDM2 protein expression in CL-3 cell line after 10 μ M B[a]P treatment for indicated times.

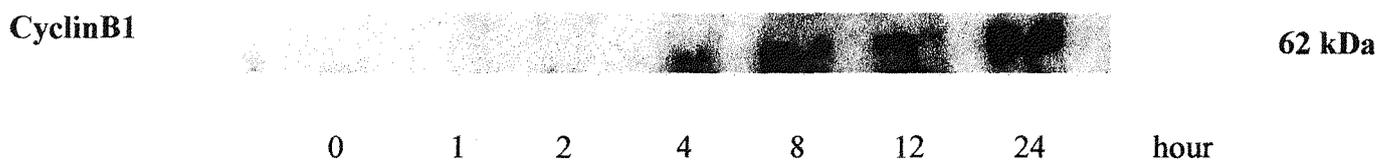


Fig.10. Western blot of Cyclin B1 protein expression in CL-3 cell line after 10µM B[a]P treatment for indicated times.

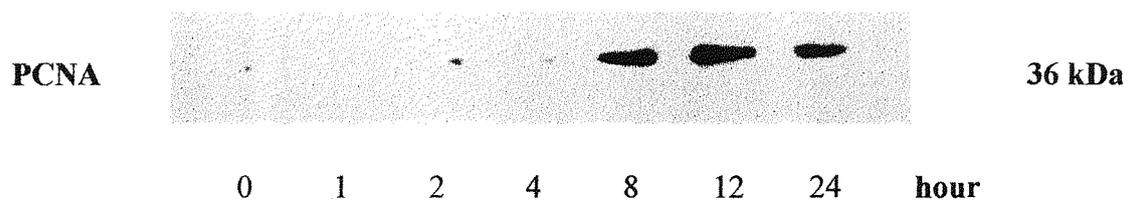


Fig.11. Western blot of PCNA protein expression in CL-3 cell line after 10 μ M B[a]P treatment for indicated times.

捌、英文摘要

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a well known carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons which are widely distributed in airborne particulate. Our previous studies have indicated that high DNA adduct levels were found in lung adenocarcinoma CL-3 cells induced by B[a]P compared with that of lung adenocarcinoma A427 cells. In order to understand why different human lung cancer cells have different DNA damages induced by B[a]P, the cell cycle and different proteins involved in the cell cycle control, such as p53, p21, MDM2, and cyclin B1 were evaluated by flow cytometry and Western blot, respectively. The flow cytometry data indicated that G2/M arrest was observed in CL-3 cells treated by 10 μ M B[a]P, whereas the proportion of S phase cell was decreased. However, the G1 phase of CL-3 cells were not changed after treatment of B[a]P. On the other hands, the cell cycle of A427 cells was not changed when the cells were treated with 1 μ M or 10 μ M of B[a]P. In Western blot analysis, we found that similar p53 protein expressions during 1 - 4 hr were revealed in CL-3 cells treated by B[a]P. The G2/M peak was observed in the period. This result suggested that p53 was not involved in G2/M arrest of CL-3 cells treated by 10 μ M B[a]P. In the period, p21 protein was almost not detected by Western blot, However, cyclin B1 protein levels were consistent with the change of G2/M arrest. From the above data, we conclude that the human adenocarcinoma CL-3 cells treated with 10 μ M B[a]P have G2/M arrest which was independent with p53 pathway.