

中文摘要

自西元 1982 年之後，惡性腫瘤便成為台灣十大死因之首位。肺癌更高居台灣地區男性及女性癌症死亡率的第二及第一位。許多研究顯示肺癌的發生與暴露環境中的致癌物有關，例如多環芳香烴類化合物（polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs）。PAHs 是一種廣泛分布於環境中的污染物，例如：香菸煙霧懸浮微粒、空氣懸浮微粒、廚房中烹調時所產生之油煙及二手煙。在肝以外的組織中，PAHs 經 cytochrome P4501A1 (CYP1A1) 代謝活化後會產生具有致癌性之代謝物，其代謝物直接攻擊細胞 DNA，產生 DNA 鍵結物。此外 PAHs 也會誘導 CYP1A1 基因表現。根據流行病學研究顯示，CYP1A1 被誘導量與肺癌易感性成正相關性，即 CYP1A1 被誘導程度高者罹患肺癌之機率較高。且已知 CYP1A1 基因表現是經由配基 (ligand) (如 B[a]P、TCDD 等 PAHs 類化合物) 所活化的 AhR 和 Arnt 形成之複合物所調控。因此本實驗之目的主要是探討 AhR、Arnt 在肺癌組織中的表現位置及強度，並研究肺癌組織及肺癌細胞株中 AhR、Arnt 與 CYP1A1 蛋白表現量或被誘導程度之相關性。本篇研究中發現在人類肺癌細胞株中，AhR 和 Arnt 蛋白及 mRNA 表現量與 CYP1A1 被 B[a]P 誘導程度成正相關，因此我們進一步以免疫組織染色方法，檢測肺腺癌及肺鱗狀細胞癌組織中 AhR、Arnt 和 CYP1A1 蛋白表現情形及其相關性。結果發現 AhR、Arnt

和 CYP1A1 主要表現於支氣管上皮細胞和腫瘤細胞中；就其表現位置而言，AhR 和 CYP1A1 表現於細胞質中，Arnt 則表現於細胞核中。據我們所知，這是首篇發現 AhR 和 Arnt 蛋白在人類肺部組織中表現情形之研究。由免疫組織染色結果發現，AhR 在女性肺癌病人腫瘤組織中表現量高於男性 ($P=0.002$)，另外 AhR 在肺腺癌病人腫瘤組織中表現量高於肺鱗狀細胞癌病人 ($P=0.013$)。Arnt 表現量與年齡、性別、抽煙狀況及其他臨床病理表徵等均無統計上之相關性。而 CYP1A1 在肺之表現量腺癌病人腫瘤組織中表現量高於肺鱗狀細胞癌病人 ($P=0.013$)。綜合上述結果，發現非抽煙之肺腺癌病人腫瘤組織中，AhR 和 CYP1A1 表現量成正相關 ($P=0.004$)，所以我們推測 AhR 高量表現，可能會促使組織表現高量 CYP1A1 蛋白，增加非抽煙者罹患肺腺癌之危險性。

英文摘要

Malignant neoplasms have been the primary cause of death in Taiwan since 1982. Lung cancer is the leading and the second-leading cause of cancer deaths among women and men, respectively, in Taiwan. Exposure to air pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), is considered as a causal factor in the development of lung cancer. High levels of PAHs were detected in cigarette smoke, airborne particulates, fumes from heated cooking oils, and passive smoking. In non-hepatic tissues, cytochrome P4501A1 (CYP1A1) is involved in converting PAHs to ultimate carcinogens, which directly attacks cellular DNA to form DNA adducts. In addition, CYP1A1 gene expression is induced by PAHs. According to epidemiological studies, the importance of CYP1A1 inducibility has been considered with regard to individual susceptibility to lung cancer. High CYP1A1 expression was associated with the increased risk of lung cancer. It is well-known that CYP1A1 gene induction is mediated through ligand-dependent heterodimerization between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). The objectives of this study were : (1) To examine the expression levels and localization of AhR, Arnt in lung tumors. (2) The correlation between AhR, Arnt and CYP1A1 expression levels . We found that CYP1A1

expression was correlated with AhR and Arnt protein and mRNA levels in human lung cancer cell lines. We further examined the expression levels and localization of AhR, Arnt and CYP1A1 in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma tissues with immuno-histochemical staining method. AhR, Arnt and CYP1A1 were found mainly in the bronchiolar epithelium and neoplasm. AhR and CYP1A1 staining were located in the cytosol, irrespective of Arnt in the nuclei of the epithelial cells in lung tumor tissues. To the best of our knowledge, this is the first finding of AhR and Arnt localization in human lung tissues. The AhR expression level were significantly higher in female than in male lung tumors ($P=0.002$). Furthermore, the AhR expression level is higher in adenocarcinoma than in squamous cell carcinoma ($P=0.013$). No significant difference in the Arnt expression level was found between different genders and pathological types. CYP1A1 levels were higher in adenocarcinomas than in squamous cell carcinomas ($P=0.013$) and CYP1A1 levels correlated with AhR levels found in non-smoker adenocarcinomas ($P=0.004$). Our data suggest that high AhR expression may contribute to high CYP1A1 expression and the non-smoker's risk of developing lung adenocarcinomas.

第一章、前言

第一節、國人肺癌之現況

近數十年來歐美國家肺癌病人有顯著增加，在台灣也是如此，目前肺癌已是國人最嚴重的癌症死亡原因。根據衛生署的統計資料顯示自西元 1982 年起，癌症即為國人十大死亡原因之首位，過去數年來國人男性癌症死亡原因中，肺癌僅次於肝癌，為癌症死亡原因的第二位；女性肺癌則高居癌症死亡原因的首位；另外根據行政院衛生署於民國 84 年之統計結果發現，診斷為肺癌者共計有 4217 人，以性別來區分，男性患者的組織型態分佈以鱗狀細胞癌最為常見，佔 30.55%。女性患者的組織型態分佈則以腺癌最為常見，佔 50.29%。在同為華人的地區，有相似的性別比例及好發肺腺癌的特徵，而發生率方面，則以新加坡最高，香港次之 (Tay, et al., 1988)。在男性 79% 的肺癌可歸因於吸菸，但女性只有 15% 的肺癌可歸因於吸煙 (陸坤泰與張登斌., 1992)。女性吸菸的比例在一般族群只有 3%。城市和鄉村地區吸菸比例相似，但肺癌發生率卻相差四倍；山胞吸菸的比例比平地還高，但肺癌的發生率相當低 (Tay, et al., 1988)；再加上性別比例偏低，及組織型態以肺腺癌偏多，這些證據都顯示：雖然香菸是一個重要因子，但在台灣應該還有其他重要的肺癌危險因子有待釐清 (Yang, et al., 1984；陸坤泰與張登斌., 1992；Tay, et al., 1988；Li, et al., 1994；蕭光明.,

1992)。

肺癌根據世界衛生組織分類，原發性肺癌主要分成四大類：鱗狀細胞癌、肺腺癌、小細胞癌和大細胞癌 (World Health Organization 1982)。而就其生物特性和臨床表現又可分為小細胞肺癌和非小細胞肺癌兩大類，後者主要包括腺癌、鱗狀細胞癌與大細胞癌三種類型。在台灣前者約佔 12~15%，後者共約 85~88%。根據腫瘤的組織學分類，可提供醫師對於腫瘤的生長型態、轉移的傾向、治療方向及預後參考等資訊。肺鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma) 又名梭狀細胞癌 (spindle cell carcinoma)：與其他的細胞型態比較起來通常生長的較緩慢，且較易固定於一處，它們通常生長於大型的支氣管，可能造成呼吸道阻塞甚至完全阻塞支氣管而導致肺膨脹不全 (atelectasis)，也因此使得它們能比其他種類肺癌較早被醫師所發現。鱗狀細胞癌其發生原因之一被認為與多量吸菸有關，並以男性病人居多。此種腫瘤的治療選擇為外科手術切除，若能及早發現及診斷為尚未轉移的腫瘤，則其五年存活率可達 50%。肺腺癌 (adenocarcinoma) 又名細支氣管肺泡腺癌 (bronchioloalveolar adenocarcinoma) 或肺泡癌 (alveolar cell carcinoma)：腺癌的細胞排列與腺相類似，就發生部位而言，95% 以上的肺腺癌是從肺支氣管末梢發生且多為於肺部周邊，有時也發生在粗大支氣管上皮但卻是極少數的病例，因此往往到了疾病的末期才會發生症狀，與肺

鱗狀細胞癌不同的是此種癌症與吸菸並無明顯的相關性。此種病人通常以手術治療，但其預後情形並不佳，組織學上的型態可由形成類似肺泡結構之分化良好的柱狀上皮細胞至排列呈不規則片狀之分化不良細胞。大細胞肺癌 (large cell carcinoma)又名亮細胞肺癌 (clear cell carcinoma):較常發生於末梢支氣管與其他組織型態的癌症相比，病人年齡以 40~50 歲者居多。由於增值速度快早期就會轉移，所以幾乎沒有早期發現此種肺癌的可能性，因此預後狀況極不理想。小細胞肺癌 (small cell carcinoma)又名複合小細胞癌 (combined small cell carcinoma) 或燕麥細胞癌 (oat cell carcinoma)：多數發生於中樞粗大支氣管但有時會發生於末梢支氣管，小細胞癌在肺癌中其發生率約 15%，屬發生率較低的組織型態。但卻是惡性極高的癌，它們通常擁有高度的生長力及快速的侵犯力，約有 70%的機會在其診斷出來時已發生遠端轉移。此種腫瘤的治療選擇以全身性化學療法為主。

整體而言，非小細胞肺癌的生長較遲緩，轉移也較慢，根治的辦法是趁早手術將腫瘤完全切除。相對於非小細胞肺癌，小細胞肺癌生長快速，很快就會發生擴散轉移，但是他對化學及放射線治療相當敏感，有八成以上的反應率，因此治療以全身性的化學藥物療法為主。肺癌病人的預後普遍不佳，五年的存活率僅約 10%。

第二節、Benzo[a]pyrene (B[a]P)與肺癌之相關性

(一) B[a]P 在環境中主要來源及其分布情形

B[a]P 為多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons , PAHs) 的主要成分之一。而 PAHs 是一種廣泛分布於環境中的污染物，其所包含的種類相當多，通常是有機物不完全燃燒所致，其來源包括：發電廠石化燃料、焚化爐中廢棄物的高溫燃燒、家庭用的瓦斯加熱器、煤油加熱器、電鍍工廠、鑄造工廠、及熔煉工廠等所排出的污染物 (Hazardous Substances Data Bank, 1988 ; Lee, et al., 1994a,b)。另外，香菸煙霧懸浮微粒，汽機車、運輸貨車、飛機及割草引擎所排放的廢氣 (Venier, et al., 1985)，也都是空氣中 PAHs 的主要來源。除此之外，每日進食的食物，如餅乾、燒烤牛肉 (Lioy, et al., 1988 ; Rothman, et al., 1990)和台灣常使用之食用油(如玉米油、蔬菜油)加熱所生成的油煙中也都含有 PAHs 類化合物，如 B[a]P、BPDE (Chiang, et al., 1999 ; Li et al., 1994)。

(二) Benzo[a]pyrene 之代謝活化路徑

環境中許多化學物質進入人體後並不會直接導致癌症，這些外來物質經過人體的代謝作用後，大部分會排出體外，只有少部分經代謝活化後形成致癌物質。人體對外來物質的代謝包括兩階段，第一階段酵素 (phase I enzyme) 主要是氧化、還原及水解反應，將外來物加上或暴露出官能基，

以便進行第二階段酵素反應，第一階段酵素以細胞色素 P450 (cytochrome P450) 為主。第二階段酵素 (phase II enzyme) 主要作用是接合反應，增加第一階段反應後產物的水溶性而排出體外，第二階段酵素包括穀胺基硫轉移酵素 (glutathione S-transferase, GST) 及氮乙炔基轉移酵素 (N-acetyltransferase)(Geroge, et al., 1994)等。

人類 cytochrome P4501A1 (CYP1A1) 是屬於 phase I 酵素，可以將前致癌物氧化成親電子的中間產物，此酵素主要存在於肝以外組織中如肺臟、皮膚中，而於肺中 CYP1A1 主要分佈於肺支氣管上皮細胞，肺泡 type II 細胞及肺泡巨噬細胞內 (Wheeler, et al., 1991)，且已知 CYP1A1 參與代謝活化 B[a]P 和其他多環芳香烴類化合物 (PAH) (Shimada, et al., 1992)。當 PAH 經 CYP1A1 酵素代謝後會氧化 PAH 形成 phenoles 與 epoxides 結構：以 B[a]P 為例，B[a]P 有許多代謝路徑，其中主要是經由 cytochrome P450 1A1 酵素系統先代謝活化後，最終生成(-)-trans-7,8-dihydroxy- 7,8-dihydro benzo[a]Pyrene，然後再繼續氧化形成最終代謝物 :anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro benzo[a]pyrene (BPDE)，它會直接攻擊 DNA，因此具有致突變性、致癌性和致腫瘤性。而代謝物主要攻擊 DNA 的 deoxy guanosine (dG)之 N₂ 位置(Jeffrey, et al., 1976)。另一個主要代謝路徑是單電子氧化 B[a]P，而產生 radical cation，

它就會攻擊 DNA 的 deoxyguanosine 之 N₇ 胺基的位置，而形成 DNA 鏈結物 (Cavalieri and Rogan, et al, 1992)。

CYP1A1 除了代謝活化 PAH 外，CYP1A1 酵素活性亦可被 PAH 化合物誘導，包括 TCDD、benzo[a]pyrene (B[a]P) 和 3-methylcholanthrene (3-MC) 等。已有研究指出 PAH 對小鼠的致癌性與其誘導 CYP1A1 的能力有關 (Nebert and Tones, 1989 ; Shimizu, et al., 2000) ，PAH 誘導 CYP1A1 的能力愈強者，則誘導小鼠癌症發生的機率愈大。

第三節 B[a]P 之毒性

目前已有許多研究顯示 B[a]P 具有致癌性、致突變性、致畸胎性等等之毒性。B[a]P 在動物實驗中已被證實為致癌物 (Nebert, et al., 1989 ; Shimizu, et al., 2000)。Shimizu 等人 (2000)每週塗抹一次 200 μg B[a]P 於 C57BL/6J 小鼠皮膚上，持續 24 週後會使小鼠產生鱗狀細胞癌、乳頭狀瘤 (papilloma)和 keratoacanthoma 等三種皮膚腫瘤；而於實驗第一和第八天以 2 mg B[a]P 皮下注射於 C57BL/6J 小鼠，17 週後發現有纖維肉瘤 (fibrosarcoma)、橫紋肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma)和鱗狀細胞癌等三種皮下腫瘤產生。Iwagawa 等人 (1989)將 0.03-1.0mg B[a]P 注射入大鼠肺部經 104 週後，會造成大鼠產生肺部腫瘤而且與肺癌的發生率有劑量反應關係。

Hecht 等學者 (1994)將小鼠體內注射 24 μ mole B[a]P 九週後，會誘導小鼠肺臟形成腫瘤。至於對人類之毒性方面，B[a]P 被歸類為 group 2A (可能造成人類致癌)的致癌物 (IARC 1987)。在 B[a]P 之致突變性研究方面，B[a]P 已被學者以 *Dlb-1* mutation assay 證實為致突變物 (Brooks, et al., 1999)，Fung 等學者 (1999)利用 *Salmonella typhimurium* TA100 所進行的 Ame's test 同樣地證實 B[a]P 具有致突變性。另外 Wolterbeek 等人 (1993)研究中指出，持續 48 小時以導管將附著有 B[a]P 的 Fe_2O_3 顆粒灌入小鼠氣管中，結果在小鼠氣管中僅發現一種 DNA 鍵結物，為 B[a]P 代謝物 (BPDE)與 DNA 所形成的 DNA 鍵結物 dG-(+)-BPDE。Sohodet 等人 (1993)以柴油引擎排放物處理人類淋巴球細胞後，在細胞 DNA 中測得五種 DNA 鍵結物，其中最主要的 DNA 鍵結物為 BPDE 與 DNA 之鍵結物。而 Barbieri 等學者 (1986)則發現了 B[a]P 及其代謝物 BPDE、B[a]P-4,5-epoxide 和 6-methyl B[a]P 具有致畸胎性，分別將 0.4-16 nmol/embryo BPDE、B[a]P-4,5-epoxide 和 6-methyl B[a]P 注射入懷孕期 swiss 小鼠子宮中，發現出生後 18 天之小鼠產生胸裂、腹裂 (thoraco-,gastroschisis)、短肢 (phocomelia)、水腫等畸形症狀。亦有實驗證實 B[a]P 會導致 CD-1 小鼠產生前神經孔封閉 (anterior neuropore closure)及脊柱扭曲等畸胎 (Winn, et al., 1997)。Harris 等人 (1991)發現 B[a]P 會造成 *ras* 原致癌基因 (protooncogene)之第 12 密碼 (codon)發

生 G T transversion。Cherpillod and Amstad (1995)的研究結果顯示 B[a]P 會造成 P53 抑癌基因之第 248 及 249 密碼發生 G T transversion。這些結果都證實 B[a]P 確實會引起人類和動物的基因發生突變，進而導致人類癌症之發生。

第四節、CYP1A1 inducibility 與肺癌易感性之相關性

流行病學的研究已證實，CYP1A1 inducibility (即 CYP1A1 被誘導能力) 有個體差異性，且 high CYP1A1 inducibility 與肺癌之間有正相關性 (Kellermann, et al., 1973)。Kellermann 等學者對美國人的病例對照研究 (case-control study) 中發現 CYP1A1 inducibility (以 AHH assay 測得) 與肺癌有關，實驗分別將肺癌病人與對照組的血液淋巴球處理 3-methylcholanthrene (3-MC) 類化合物之後，測其 AHH 酵素活性用以代表 CYP1A1 inducibility，發現有 30 % 肺癌病人屬於高 AHH 酵素活性而對照組中僅有 9 %；肺癌病人中屬於低 AHH 酵素活性僅佔 4 %，而在對照組中高達 44.7 %，由此顯示高 AHH 酵素活性有較高罹患肺癌的危險 (Odds ratio = 36.0)。另外，Kouri 等學者發現有抽煙習慣的肺癌病人血液淋巴球的 AHH 酵素活性較無抽煙習慣之非肺癌病人高出兩倍之多 (Kouri, et al., 1982)，而且 AHH 酵素活性與肺中 B[a]P 代謝物與 DNA 所形成的鍵結物

成正相關 (Bartch, et al., 1992 ; Alexandrov, et al., 1992) 。因此 CYP1A1 inducibility , 被認為是造成個體間肺癌易感性不同的重要原因之一。

在動物實驗中亦證實 CYP1A1 inducibility 與 PAH 誘導產生癌化功能有強烈相關性 (Nebert, et al., 1969)。Nebert 等學者首先發現 , 在不同品種小鼠中 CYP1A1 inducibility 有明顯不同 , 將 80 mg/Kg 3-MC 分別注射到 C57BL/6 和 DBA/2 小鼠腹腔中 48 小時後 , 以 AHH assay 來偵測 CYP1A1 inducibility , 結果發現 3-MC 會增加 B6 小鼠約 6 倍的 AHH 酵素活性 , 而 D2 小鼠則無。因此 B6 小鼠被認定為 arylhydrocarbon responsive (Ah-responsive) 小鼠 , 而 D2 為 Ah-nonresponsive。另外 , Nebert 等學者也發現將 150 μ g 3-MC 或 B[a]P 經皮下注射於 Ah-responsive 和 Ah-nonresponsive 小鼠中 , 持續觀察 8 個月後 , 證實 Ah-responsive 小鼠易導致細胞癌化而產生皮下纖維肉瘤 (subcutaneous fibrosarcomas)。因此 , 在肺癌易感性中 CYP1A1 是重要的危險因子。

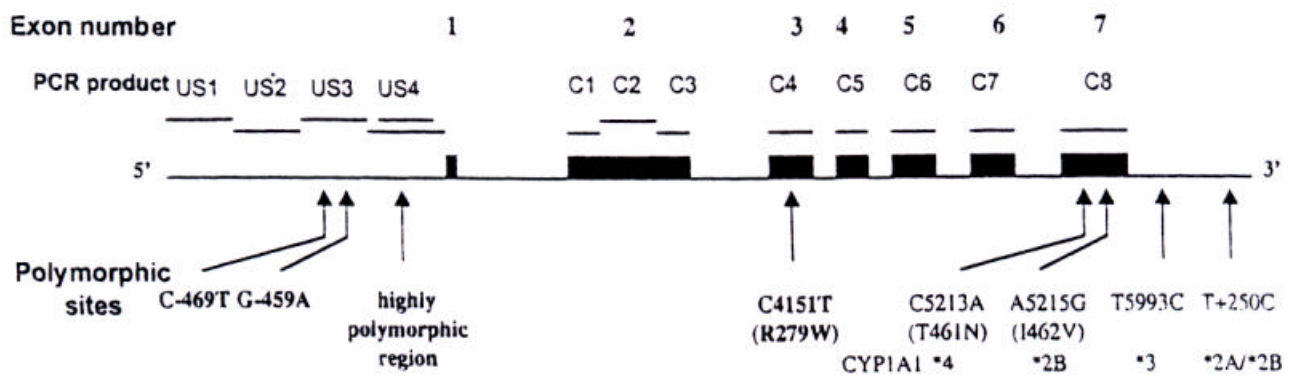
CYP1A1 inducibility 個體差異之因素目前並不清楚 , CYP1A1 基因多型性已被證實是一影響因素 , 而早在西元 1973 年 Kellermann 等學者便發現 CYP1A1 基因多型性會影響到人類 CYP1A1 酵素活性。目前發現的 CYP1A1 基因多型性有四個 : 一是 3' -flanking region 上第 250 個鹼基由 T 突變成 C 會產生 *Msp*I 酵素切點 ; 二是在 exon 7 上第 462 個胺基酸由

isoleucine 變成 valine；三是第 5993 個鹼基由 T 突變成 C；另一個 exon 7 上的第 5213 個鹼基由 C 突變成 A (Cascorbi, et al., 1996)，而最近 Smart and Daly (2000)兩位學者利用 single-strain conformational polymorphism analysis (SSCP)發現另外三個新的 polymorphism site 分別為 C4151T、G-459A、C-469T (附錄一)。而有研究指出：CYP1A1 *MspI* 基因多型態與 PAH-induced CYP1A1 酵素活性有關。Kiyohara 等人針對日本 Fukuoka 地區 84 個健康的志願者所分離出之週邊血液淋巴球，處理 3-methylcholanthrene (3-MC) 後發現，*MspI* mutant 的細胞 CYP1A1 酵素活性被誘導的程度是其他基因型的 3 倍 (Kiyohara, et al, 1996)；但是也有文獻指出 CYP1A1 *MspI* 基因多型態與 CYP1A1 酵素活性沒有顯著相關性 (Crofts et al, 1994)。

另外，CYP1A1 基因多型性也被認為與肺癌易感性有相關性 (d' Errico, et al., 1996)。Kawajiri 等學者 (1990)對日本肺癌病人進行病例對照研究 (case-control study)，指出肺癌病人中 *MspI* polymorphism homozygous rare allele (genotype C)對偶基因頻率是健康受試者的 3 倍。這是首次發表 CYP1A1 *MspI* 基因多型態與肺癌有關的研究。Kawajiri 等人的研究進一步指出，日本肺癌病人與健康受試者 genotype C 頻率分別是 21.2%與 10.6%，故作者認為 genotype C 會增加罹患肺癌的危險性。Nakachi 等學者在

case-control study 中也發現低抽煙量的人，且 CYP1A1 基因多型態為 genotype C 者罹患肺鱗狀細胞癌的危險性比其他基因型的 7.3 倍。而 Xu 等學者在針對高加索人 (Caucasians) 的研究中發現，異質基因型 (genotype B) 與同質基因變異型 (genotype C) 會增加罹患肺癌的危險性。綜合上述文獻可知 CYP1A1 基因多型態可能會影響到 CYP1A1 inducibility，且與肺癌的發生有相關性。又知 CYP1A1 基因表現受 AhR 與 Arnt 所調控 (Bigelow, et al., 1982; Whitlock, et al., 1996)。因此本篇研究我們進一步探討在肺癌中，影響 CYP1A1 inducibility 的可能因素 - CYP1A1 酵素活性、AhR、Arnt 蛋白量表現之相關性。

附錄一、CYP1A1 基因多型性位置



Smart and Daly (2000)

CYP1A1 基因多型性有四個：一是 3'-flanking region 上第 250 個鹼基由 T 突變成 C 會產生 *Msp*I 酵素切點；二是在 exon 7 上第 462 個胺基酸由 isoleucine 變成 valine；三是第 5993 個鹼基由 T 突變成 C；另一個 exon 7 上的第 5213 個鹼基由 C 突變成 A (Cascorbi, et al., 1996)，而最近 Smart and Daly (2000)兩位學者利用 single-strain conformational polymorphism analysis (SSCP)發現另外三個新的 polymorphism site 分別為 C4151T、G-459A、C-469T。

第五節、Aryl hydrocarbon receptor(AhR)與 Ah-receptor nuclear translocator(Arnt)

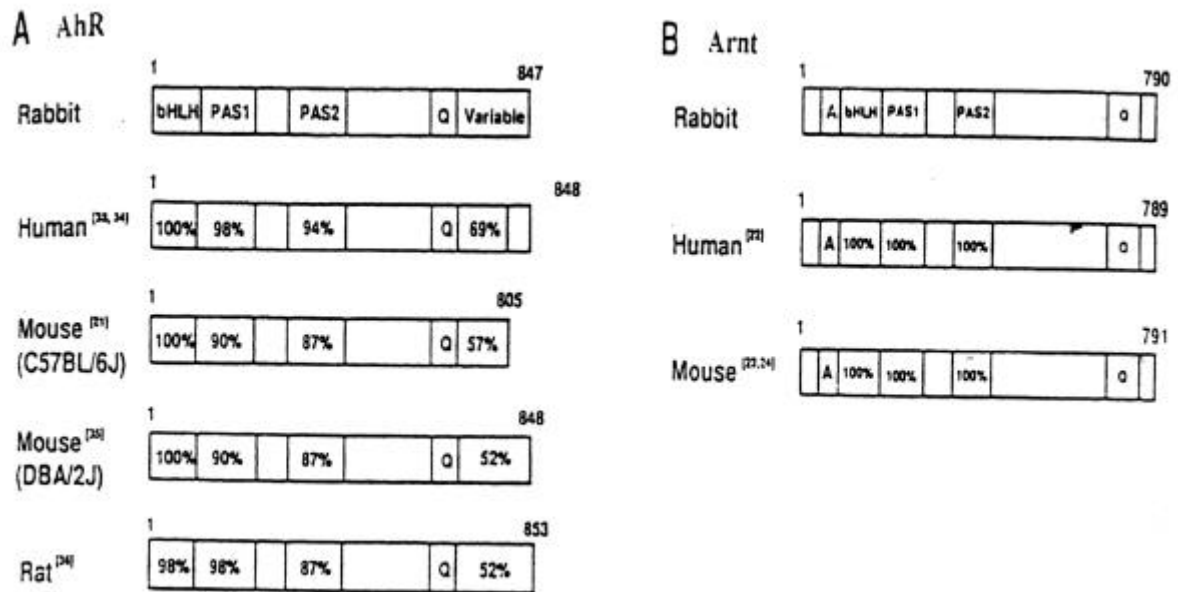
(一) AhR 與 Arnt 之結構與功能

AhR 與 Arnt 的分子量大小,因動物種類不同而各有差異。兔子的 AhR 含有 847 個胺基酸 (Takahashi, et al.,1996),在人類為 848 個胺基酸 (Itoh, et al.,1993 ; Dolwick, et al.,1993) , 在 C57BL/6J 小鼠為 805 個胺基酸 (Ema, et al.,1992) , 在 DBA/2J 小鼠中包含 847 個胺基酸 (Chang, et al.,1993) , 在大鼠中包含 853 個胺基酸 (Carver, et al.,1994) ; 而 Arnt 在兔子中含 790 個胺基酸 (Takahashi, et al.,1996) , 在人類中包含 789 個胺基酸 (Hoffman, et al.,1991) , 在小鼠中包含 791 個胺基酸 (Li, et al.,1996 ; Reisz-Porszasz, et al.,1994) (附錄二)。

AhR 與 Arnt 均屬於典型 basic helix-loop-helix/Per-AhR(Arnt)-Sim (PAS) 類的轉錄因子 (Whitlock, et al., 1999)。PAS 包括有 AhR、Arnt、Sim (與果蠅中樞神經發育有關之蛋白)、Per (與果蠅中調控週期性有關之蛋白)這類蛋白均含有一段約 250 胺基酸所組成同源區域 (homology region)稱之為 PAS domain (Per,AhR-Arnt,Sim)。AhR 與 Arnt 在結構極為相似主要分為三個部分,以人類 AhR 為例 (全長 848 個胺基酸):第一部份是在 N-terminal 有一段 basic helix-loop-helix (bHLH) domain (1-112 個胺基酸) , 是作為和

DNA 鍵結之用；第二部份是接在 bHLH 後包含約 260 個胺基酸的片段，稱之為 PAS domain (113-387 個胺基酸)，其中又可分為 PAS A 與 PAS B 兩個區域，主要是與一些外來配基 (ligand，例如 TCDD：2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin；3-MC：3-methylcholanthrene； α NF： α -naphthoflavone 等)及 HSP90 鍵結，同時 PAS domain 亦可與 Arnt 鍵結以進行二聚合作用 (dimerization)；最後一部份是接近 C-terminal 的 Q-rich domain (387-848 個胺基酸)，主要是調控下游基因之轉錄活化功能 (transactivation)。而人類 Arnt 亦可分為三個部分 (全長 789 個胺基酸)分述如下：第一部份是在 N-terminal 有 bHLH domain (1-167 個胺基酸)，功能是與 DNA 鍵結的位置；第二部份是接在 bHLH 後包含約 250 個胺基酸的片段，稱之為 PAS domain (168-407 個胺基酸)，其中包含 PAS A 與 PAS B，主要是和 AhR 進行 dimerization；C-terminal 則同樣為 Q-rich domain (408-789 個胺基酸)，主要是調控下游基因之 transactivation 的進行 (附錄三)。

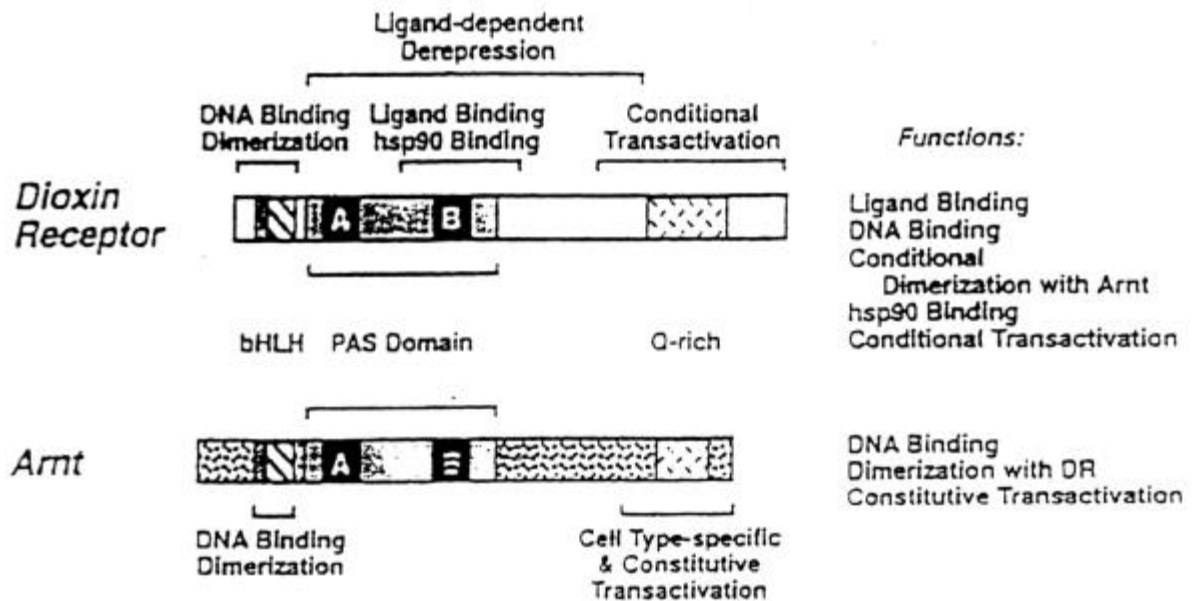
附錄二、AhR 與 Arnt 之結構



(Takahashi, et al., 1996)

AhR 與 Arnt 的分子量大小，因動物種類不同而各有差異。兔子的 AhR 含有 847 個胺基酸，在人類為 848 個胺基酸，在 C57BL/6J 小鼠為 805 個胺基酸，在 DBA/2J 小鼠中包含 847 個胺基酸，在大鼠中包含 853 個胺基酸；而 Arnt 在兔子中含 790 個胺基酸，在人類中包含 789 個胺基酸，在小鼠中包含 791 個胺基酸。

附錄三、AhR 與 Arnt 之結構功能



AhR 與 Arnt 均屬於典型 basic helix-loop-helix/Per-AhR(Arnt)-Sim (PAS)類的轉錄因子。AhR 與 Arnt 在結構極為相似主要分為三個部分，第一部份是在 N-terminal 有一段 basic helix-loop-helix (bHLH) domain，是作為和 DNA 鍵結之用；第二部份稱之為 PAS domain，其中又可分為 PAS A 與 PAS B 兩個區域，PAS domain 是作為 AhR, Arnt 進行二聚合作用 (dimerization)之用，另外 AhR 的 PAS domain 也會與外來配基(ligand，例如 TCDD, 3-MC, α NF 等)及 HSP90 鍵結；最後一部份是接近 C-terminal 的 Q-rich domain，主要是調控下游基因之轉錄活化功能(transactivation)。

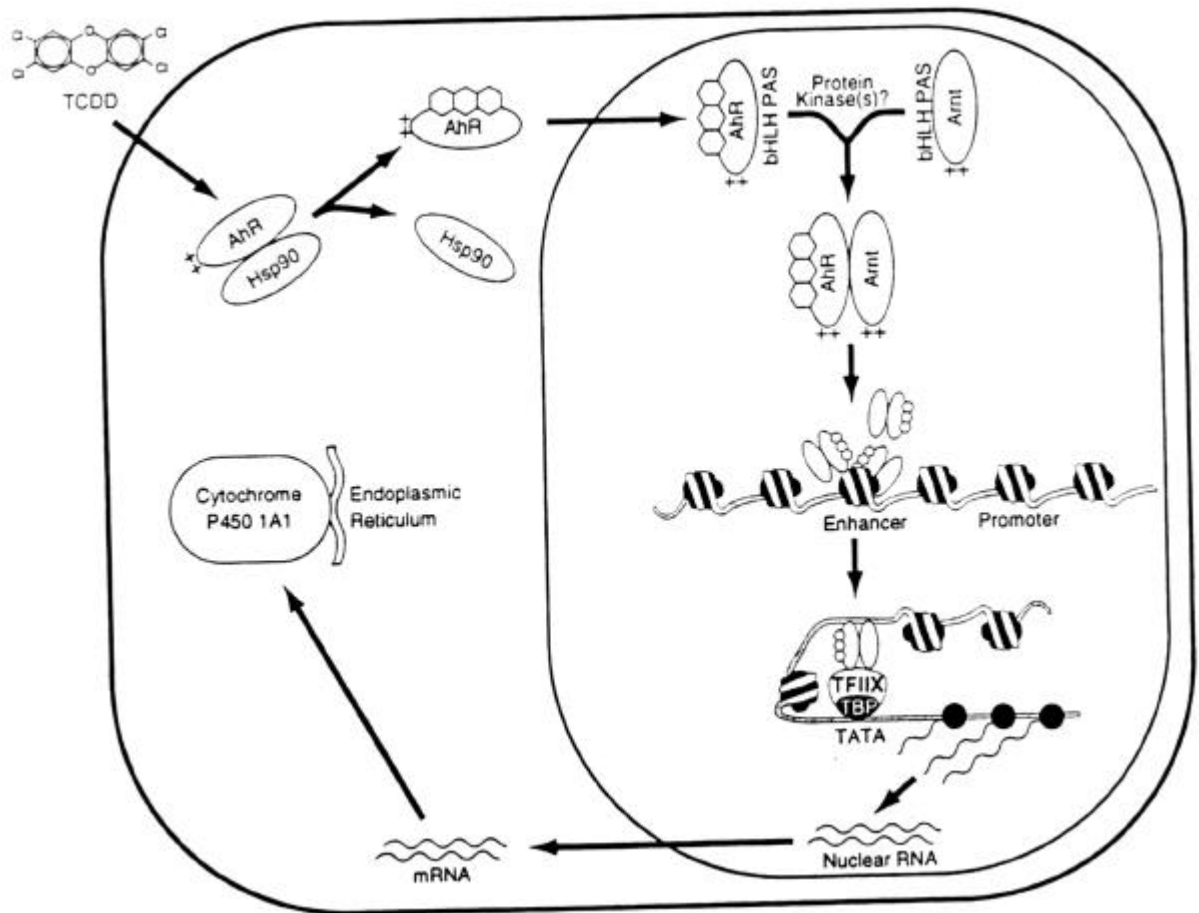
(二) PAHs 經由活化 AhR/Arnt 來調控 CYP1A1 基因之表現

已知 PAHs 會經由活化 AhR/Arnt 來調控 Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)、Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1)、NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutathione-S-transferases (GST) 及 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 基因的表現 (Nguyen, et al., 1994)。AhR 通常存於在細胞質中且與 90KDa heat-shock protein (HSP90) 形成穩定複合物 (Perdew, et al., 1988), 當 PAHs 進入細胞質中會和 AhR 鍵結 (Pollenz, et al., 1994), 此時 AhR 上的 HSP90 會和 AhR 分離 (Pongratz, et al., 1992; Chen, et al., 1995), 接著 PAHs-AhR 複合體會進入細胞核中 (Okey, et al., 1980), 與核中 Arnt 形成複合體 (Hoffman, et al., 1991; Perdew, et al., 1992), 此複合體會專一性鍵結到 CYP1A1 基因上游 aromatic hydrocarbon- or dioxin- or xenobiotic-responsive elements (AhRE or DRE or XRE) (Denison. et al., 1988; Swanson. et al., 1993; Okey. et al., 1994), 進而促進 CYP1A1 (附錄四)、CYP1B1、NQO1、GST 及 ALDH 基因轉錄 (Israel, et al., 1984)。因此其誘導程度取決於多環芳香烴類化合物 (PAHs) 與 AhR 鍵結之程度。另外在 1996 年 Hoffer 等人的研究中指出, 在老鼠肝癌細胞中處理 TCDD 或 B[a]P 後, 會誘導 c-fos, c-jun, junB 和 junD 等 oncogenes 的表現, 並進一步證實是藉由 AhR 來調控 c-fos 和 jun 基因的表現。

PAHs 除了藉由 AhR/Arnt 調控 CYP1A1 基因表現, 另一方面也有研究

指出 AhR 基因多型性可能會影響 CYP 1A1 酵素活性 (Smart and Daly 2000)。已發現之人類 AhR polymorphism site 有兩個均存於 exon 10 中，分別為第 1721 個鹼基由 G 突變成 A (G1721A)及第 1768 個鹼基由 G 突變成 A (G1768A) (Smart and Daly 2000)。Smart 和 Daly 學者在針對白種人研究中發現，AhR G1721A 突變基因型之 CYP1A1 酵素活性明顯高於 G1721A 野生型，但 Kawajiri 等學者 (1995)在針對日本人的研究中顯示，G1721A 基因多型性與肺癌無相關性。人類 AhR G1768A 基因型則於西元 2000 年首次發表於 Pharmacogenetics 期刊中，故對於此位置之基因多型態和 CYP1A1 酵素活性之相關性仍不清楚。所以關於 AhR polymorphism 是否會影響 CYP 1A1 酵素活性仍未有定論。

附錄四、AhR/Arnt 調控 CYP1A1 基因表現之路徑圖



Whitlock, et al., 1996

AhR 通常存於在細胞質中且與 90KDa heat-shock protein (HSP90)形成穩定複合物，當 TCDD 進入細胞質中會和 AhR 鍵結，此時 AhR 上的 HSP90 會和 AhR 分離，接著 TCDD-AhR 複合體會進入細胞核中，與核中 Arnt 形成 TCDD-AhR-Arnt 複合體，此複合體會專一性鍵結到 CYP1A1 基因上游之 xenobiotic-responsive elements (XRE)，進而促進 CYP1A1 基因轉錄。

(三)AhR 於動物體內所扮演之角色

Fernandez-Salguero (1996)等人指出在缺乏 AhR 的小鼠中發現其免疫系統會受到損傷，且肝臟會有纖維變性的現象，表示 AhR 在小鼠肝臟的正常功能及免疫系統中扮演一個重要的角色。Pedro 等人在 1996 年的研究中指出，缺乏 AhR 的小鼠在經過 TCDD 處理後，對其肝臟、胸腺、心臟、腎臟、胰臟、脾臟、淋巴結和子宮等，並不會造成明顯的傷害，即表示 TCDD 必須透過 AhR 對小鼠產生毒性影響 而在最近 Shimizu 等學者發表於 2000 年 PNAS 期刊的研究報告，更直接證實 AhR 在 B[a]P 誘導小鼠腫瘤過程中扮演重要角色。作者將 B[a]P 直接塗抹或皮下注射於 AhR(+ / +)及 AhR knock-out [包括 AhR (+ / -) (- / -)]C57BL/6J 小鼠中，發現只有 AhR(+ / +) (+ / -) C57BL/6J mice 有鱗狀細胞癌、乳頭狀瘤、纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤等腫瘤產生，處理 B[a]P 的 AhR(- / -) C57BL/6J 小鼠則均無腫瘤產生 (Shimizu, Y., 2000)。由上述可知，AhR 與 PAH 之毒性反應以及致腫瘤化過程中扮演重要角色，然而我們對於 AhR 的了解仍局限於外來配基 (ligand)與 AhR 鍵結活化後所產生之影響，但對於內生性配基及可能影響 AhR 傳導路徑之因素至今仍不清楚。

(四)Arnt 於動物體內所扮演之角色

最近研究顯示在體內低氧狀態下，Arnt 會與 HIF1 (hypoxia-inducible

factor 1)蛋白形成複合體 (Wang, et al., 1995)。Arnt-HIF1 複合體可藉由與紅血球生成素 (erythropoietin)或其他細胞氧化所生成之中間物刺激，促進 hypoxia response element (HRE) 結合，而啟動基因轉錄 (Wang and Semenza, 1993 ; Semenza, 1994)。由此可知 AhR 和 HIF1 均能與 Arnt 形成複合體 因此當 TCDD 進入細胞，會與 AhR-Arnt 形成複合體進而與 DRE 結合，啟動 CYP1A1 之基因轉錄；當細胞處於低氧狀態下，HIF1 會與 Arnt 形成複合體進而與 HRE 結合，誘發 erythropoietin 基因之轉錄，因此使細胞能適應低氧狀態。

第六節、研究動機

根據衛生署的統計資料顯示，自 1982 年起癌症即為國人十大死亡原因之首位。過去數年來國人男性癌症死亡原因中，肺癌僅次於肝癌，為癌症死因之第二位；女性肺癌則高居癌症死因第一位。因此研究台灣肺癌之致癌機轉及其可能的危險因子，一直是毒理所共同致力的研究主題，以期能找出導致台灣肺癌高死亡率的可能原因。

許多研究顯示肺癌的發生與暴露環境中的致癌物有關，例如多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons , PAHs) PAHs 是一種廣泛分布於環境中的污染物，例如：香菸煙霧懸浮微粒、汽機車引擎所排放的廢

氣 (Venier, et al., 1985)、 廚房中烹調時所產生之油煙 (Chiang, et al., 1999 ; Gao, et al., 1996)、 二手煙 (Wen, et al., 1994)等 , 而 B[a]P 則是 PAHs 的主要成分之一。由流行病學之研究結果證實 , 個體間對肺癌感受性 (susceptibility)之差異性與 CYP1A1 酵素活性被誘導之程度有關。CYP1A1 不只能被多環芳香烴類化合物所誘導 , 並且參與代謝活化多環芳香烴類化合物之反應。此外 PAHs 誘發 CYP1A1 基因轉錄之機轉主要受到 bHLH/PAS 轉錄因子 AhR、Arnt 所形成之二聚體 (heterodimer)所調控。AhR 參與調控許多代謝藥物酵素以及與細胞生長分化相關等基因之轉錄 , 最近 Shimizu 等學者 (2000)以 AhR knock-out 小鼠證實 , 必須有 AhR 存在下 B[a]P 才能誘發小鼠腫瘤。因此本實驗之目的主要是 (1)探討 AhR、Arnt 在肺癌組織中的表現位置及強度 ; (2)分析肺癌組織及肺癌細胞株中 AhR、Arnt 與 CYP1A1 蛋白表現量之相關性。

第二章、材料與方法

壹. 材料：

一. 材料與藥品：

RPMI medium 1640 , fetal bovine serum (FBS) , penicillin, streptomycin , sodium pyruvate , non-essential amino acid (NEAA) , glutamine , Super Script TM II RT , TRIzol reagent , 購自美國 GIBCO BRL 公司；細胞培養皿由丹麥 Nunc 公司購得；bovine serum albumin (BSA) , trypsin , dimethyl sulfoxide (DMSO) , benzo[a]pyrene (B[a]P) , ethidium bromide (EtBr) , trypan blue solution (0.4%) , ammonium persulfate (APS) , tetramethylethylenediamine (TEMED) , glutathione , pepstatin A , aprotinin , β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH) , leupeptin , phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)由美國 Sigma 公司購得；normal melting agarose (NMA)由美國 FMC 公司購得；anti-mouse IgG-HRP 由 Santa Cruz Biotechnology 公司購得；potassium acetate 由日本和光純藥工業公司購得；Syringe filter 由美國 Gelman 公司購得；anti-rabbit IgG-HRP 由購自 Calbiochem , Western blotting detection reagents 1,2 (ECL)由英國 Amersham International 公司購得；Bio-Rad protein assay reagent 由美國 Bio-Rad 公司購得；BCA protein assay reagent 由美國 Pierce 公司購得；有機溶液由台灣皓峰公司及聯工化學股份有限公司購得。

二. 人類肺癌細胞株之來源：

人類肺癌細胞株 (human lung carcinoma cell lines)H23、H1355、H226 由台北榮民總醫院胸腔腫瘤科主任蔡俊明醫師所贈予，其中 H23 和 H1355

為人類肺腺癌細胞株 (human lung adenocarcinoma cell lines), 而 H226 為人類肺鱗狀細胞癌細胞株 (human lung squamous cell carcinoma cell lines)。

三. 檢體來源

肺癌病人腫瘤組織由台中榮總胸腔外科和中山醫學院附設醫院病理科提供, 所有組織都是經由外科手術取出, 接著處理福馬林後再以石蠟將組織塊包埋儲存, 並經過病理檢驗確定為肺之腫瘤組織。肺癌病人腫瘤組織共 60 個, 其中包括 37 個肺腺癌病人腫瘤組織及肺鱗狀細胞癌病人腫瘤組織 23 個。在進行免疫組織染色時, 有些病人腫瘤組織切片數量不夠, 所以染 AhR 病人腫瘤組織切片部份與染 Arnt 或 CYP1A1 的病人略有差異, 但染 AhR、CYP1A1 總檢體數不變均為 55 個, 而 Arnt 則為 54 個。

貳. 方法

一、細胞培養

H23、H1355 和 H226 細胞株均以含有 5 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine 和 100 unit/ml penicillin/streptomycin 之 RPMI 細胞培養液培養, 將細胞株置於含 5 % CO₂ 的 37 恆溫培養箱內培養, 每二天更換一次新鮮的培養液, 每株細胞均間隔三 四天便須分盤培養。

細胞分盤, 首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出, 加入 10 ml phosphate buffer saline (0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.11 % Na₂HPO₄, 0.02 % KH₂PO₄) 緩衝溶液洗一下, 然後將 PBS 緩衝溶液吸出, 再加入 1 ml (0.005 % Trypsin、0.002 % EDTA) trypsin 溶液 (為一種內切, 能幫助當 trypsin 溶液覆蓋所有細胞後, 即馬上吸出 (盡量吸乾, 因為 trypsin 對細

胞會有傷害) , 置於 37 培養箱 5 分鐘, 使細胞能脫離培養皿, 5 分鐘可利用顯微鏡 (OLYMPUS-CK40) 觀察細胞是否已脫離培養皿 (若尚未完全脫離, 可用手輕輕拍打培養皿邊緣, 以幫助細胞脫落), 細胞脫落後, 以 10 ml trypsin 抑制劑 (用含有血清的細胞培養液即可) 沖洗細胞, 並將細胞吸出, 至於 15ml 離心管中, 於 4 離心 900 rpm (KUBOTA 2010) 5 分鐘後, 將上清液去除 (盡量吸乾), 再加入適當細胞培養液, 待混合均勻後, 以 2×10^6 個細胞/10 公分培養皿為培養密度種入培養皿中。

二、RNA 純化

將 H23、H1355 和 H226 細胞培養三~四天後 (約 10 公分培養皿之八~九成滿), 以 TRIzol Reagent (GIBCOBRL) 抽取 RNA (Chomczynski et al., 1987)。步驟如下: 移除 10 cm 培養皿中舊的培養液, 以 PBS 洗二次後, 加入 1ml 的 TRIzol Reagent 使其完全覆蓋住培養皿, 在室溫下靜置 5 分鐘 (TRIzol Reagent 和細胞作用後會呈現黏稠狀), 再利用括杓將細胞刮下, 將細胞移至以預先滅菌過的微量離心管中, 加入 200 μ l 的 Chloroform/isoamyl alcohol (49:1), 震盪混和後, 於室溫靜置 10 分鐘; 以 4 離心 12000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘, 將上層透明液吸出移至新的乾淨的微量離心管中, 再加入 1ml 的 isopropanol 混合均勻, 置於 -20 約 1 小時以上, 使 RNA 沉澱下來後, 於 4 離心 12000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘, 將上清液去除 (盡量吸乾) 離心後 RNA 沉澱物以 1 ml 75% cold ethanol 洗去殘餘鹽類, 再於 4 離心 7500 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘, 將上清液去除 (盡量吸乾), 於室溫下風乾。

為了避免 DNA 污染 RNA 須再用 DNase 處理 RNA 溶於 200 μ l 1x TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 與等體積 DNase working solution 混

合【20mM MgCl₂ , 2mM DTT , 0.4 μ l of ribonuclease inhibitor (20-25U/ μ l)和 2 μ g Dnase , 以 1x TE buffer 將體積補至 200 μ l】，於 37 水浴 15 分鐘。加入 100 μ l DNase stop solution (50 mM EDTA , 1.5 mM sodium acetate , 1% SDS)終止 Dnase 反應。加入 500 μ l 的 phenol、100 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol (49:1 , v/v) 混合液，混合均勻後以 4 離心 12000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘，將上層透明液吸出移至新的乾淨的微量離心管中，再加入 1ml 的 isopropanol 混合均勻，置於-20 約 1 小時以上，使 RNA 沉澱下來後，於 4 離心 12000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 20 分鐘，將上清液去除 (盡量吸乾)，離心後 RNA 沉澱物以 1ml 75% cold ethanol 洗去殘餘鹽類，再於 4 離心 7500 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘，將上清液去除 (盡量吸乾)，於室溫下風乾。最後將 RNA 溶於 30 μ TE buffer 即可。利用螢光分光光譜儀於 excitation=260nm , 與 emission = 280nm 時測其吸光值 (注意：a. OD 260/280 比值必須高於 1.5 以上；b. OD.260 若高於 2.0 則必須稀釋後再測)。必須注意的是所有與 RNA 有關的試劑必須用 DEPC water [01.% DEPC 在室溫中攪拌至完全混合以破壞 RNase 後 (約 3-4 小時), 再經溼熱高壓滅菌除去 DEPC] , 所有的器皿、用具都必須滅菌。

$$\text{公式：} \mu\text{gRNA} = \text{吸光值(OD260nm)} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{稀釋倍數}$$

三、半定量 RT-PCR(Semi-quantitative reverse transcription and

polymerase chain reaction)

(一)製備互補 DNA (cDNA)

混合 10 μ g 的 total RNA、2ng 的 oligo(dT)₁₈ 及 DEPC 處理過的無菌水共 12 μ l，先加熱 70 $^{\circ}$ C 15 分鐘破壞 RNA 二級結構後，立即置於冰上，接著加入 8 μ l 緩衝溶液 [50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、5mM DTT、5 mM dNTP] 再加入 400 U MMLV Reverse transcriptase (SuperScript™II, GIBCO)在 37 $^{\circ}$ C 加熱一小時，將 mRNA 反轉錄成 cDNA，最後再以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 cDNA (total 20 μ l)保存於-20 $^{\circ}$ C。

(二)半定量 RT-PCR

RT-PCR 主要是利用 1 μ l cDNA (大約 0.5 μ g 的 total RNA)為模版，在總反應體積為 30 μ l 的 1x 緩衝溶液中[10mM Tris-HCl (pH 8.8)、1.5mM MgCl₂、50 mM KCl、0.1% Triton X-100]，加入特定的 primer 0.2 μ M (primer 序列見附表一)、0.2mM dNTP (GIBCO-BRL,USA) 與 1 U Taq polymerase (DyNAzyme™II, Finland)。使用 UNO (Biometra) 熱循環儀將基因放大，反應條件如附表二。

定量方式：以 2%洋菜膠(agarose) 並加入 0.5 μ g/ml ethidium bromide (EtBr)於 running buffer 中染色，在 120 伏特電壓下進行電泳分析，再利用數位化影像分析系統 (AlphaImager™ 200, Alpha Innotech corporation) 在 UV 燈下依據染色強度定量。

計算公式以 H23 與 H1355 之 AhR mRNA 相對量為例：

$$\frac{\text{H23 AhR mRNA 定量值} / \text{H23 - actin 定量值}}{\text{H1355 AhR mRNA 定量值} / \text{H1355 - actin 定量值}}$$

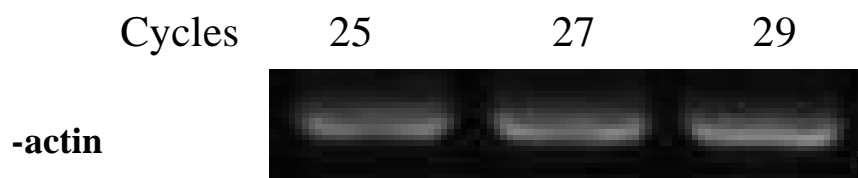
附表一、聚合酵素鍊鎖反應條件之引子序列

Gene	Primer	Reference:
AhR	5' -ATACTGAAGCAGAGCTGTGC -3' 5' -AAAGCAGGCGTGCATTAGAC -3'	Hayashi et al, 1994
Arnt	5' -CGGAACAAGATGACAGCCTAC-3' 5' -ACAGAAAGCCATCTGCTGCC -3'	Hayashi et al, 1994
b-actin	5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA -3' 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC -3'	Dehr et al, 1995

附表二、聚合酵素鍊鎖反應條件

Gene	Thermocycle		conditions		Further extension		Cycles
	Predenature		Thermocycle				
AhR	94	- 3 min	94	- 1 min.	72	- 10 min	27
			50	- 1 min			
			72	- 1 min .			
Arnt	94	- 3 min	94	- 1 min.	72	- 10 min	27
			50	- 1 min			
			72	- 1 min			
-actin	94	- 3 min	94	- 1 min.	72	- 10 min	27
			50	- 1 min			
			72	- 1 min			

附表三、 -actin 在 25,27,29 cycles 聚合酵素鍊鎖反應之表現量



為確認 -actin 在本實驗中所進行之 27cycles 聚合酵素鍊鎖反應並非處於過飽和狀態，故以 H23 細胞株之 cDNA 來檢測 -actin 在 25,27,29 cycles 聚合酵素鍊鎖反應之表現量，經定量後其讀值分別為 11890,12760,13340 所以本實驗 -actin 所進行之 27cycles 聚合酵素鍊鎖反應並非處於過飽和狀態。

四、Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 酵素測定 (Kiyohara et .al., 1996)

此方法是測試細胞內 CYP1A1 的酵素活性。細胞生長於 10 公分的培養皿，待生長至七、八分滿時，加藥處理 10 μ M B[a]P 24 小時後，移除培養液，以 10ml PBS 洗兩次，並加入 1ml PBS，以 rubber policeman (刮勺) 刮下細胞並置入 1.5 ml 微量離心管，離心於 4 7,000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘，於離心下的細胞加入 0.5 ml 細胞緩衝溶液(100 mM HEPES，1 mM MgCl₂)並以超音波 (SONICS & MATERIALS INC. VCX 600，購自 DANBURY, CT. U.S.A.)震破後，離心於 4 12,500 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 30 分鐘後取上層液，並以 Bio-Rad protein assay 定量蛋白量濃度，取細胞蛋白萃取液 100 μ g 及 1 ml 之緩衝液 (0.1 ml 1M HEPES, 10 μ l 40 mM NADPH, 1 μ l 1 M MgCl₂)，震盪混和後，靜置 2 分鐘，再加入 20 μ l 1 mM B[a]P 於 37 水浴 10 分鐘，以 1 ml 冷的丙酮中止反應，並用 3.25 ml 正己醚萃取 (震盪混和並靜置 5 分鐘)，取上層液 2 ml 加入含 2 ml 1 N NaOH 的玻璃試管中，連續震盪 15 秒後去除上層液，以螢光分光光譜儀 (HITACHI F-4500)於 excitation = 396nm，與 emission = 522nm 時測螢光值並與已知濃度的標準品 3-OH B[a]P (Midwest research institute, Kansas, Missouri)來比較，得知 cytochrome P450 1A1 的酵素活性，其酵素活性單位為 3-OH B[a]P 生成量 pmol/min/mg protein。

公式：

eq = 標準品吸光值/標準品濃度 (3.04ng/ml)

Fu = 樣品吸光值-標準品吸光值

酵素活性 = Fu/eq \times 2ml \times 2 \times (100/80) \times 1/268.3 \times 1000 \times 1/mg protein

五、蛋白定量分析

(一)Bio-Rad 試劑測蛋白濃度。

本實驗方法用於樣品中不含有：glycerol 或 SDS detergent 或 DTT 時使用。首先以 1：4 之比例混合 Bio-Rad reagent 和水成為 Bio-Rad working reagent，並取待測物 5 μ l 與標準品 (BSA) 2.5 μ g、5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 與已經稀釋的 1ml Bio-Rad working reagent 混合均勻後，以分光光度儀 (HITACHI U1500)於波長 595nm 測吸光值，再與標準品 (BSA)比較以求得待測物之蛋白濃度 (μ g/ μ l)。

(二).BCA 試劑測蛋白濃度。

本實驗方法用於樣品中含有：glycerol 或 SDS detergent 或 DTT 時 (若樣品中含 2-mercaptoethanol 時則不可用此方法，所以必須待測完蛋白後再加 2-mercaptoethanol)。首先以 1:49 之比例混合 BCA reagent A 和 reagent B 成為 BCA working reagent，並取待測物 5 μ l 與標準品 (1 μ g/ μ l BSA) 2.5 μ g、5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 與已經稀釋的 1ml BCA working reagent 混合均勻後，37 培養 15 分鐘，以分光光度儀 (HITACHI U1500)於波長 562 nm 測吸光值，再利用線性回歸分析與標準品 BSA 比較以求得待測物之蛋白濃度 (μ g/ μ l)。

六、西方墨點法

(一)製備細胞均質液

細胞生長於 10 公分的培養皿待生長至七、八分滿時，以 PBS 緩衝溶液 (0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.11 % Na₂HPO₄, 0.02 % KH₂PO₄)洗三次，再以 0.5 ml 的 PBS 將細胞刮下，置於 1.5 ml 微量離心管中，於 4 低速離心 7000 rpm (HERMLE z323k Centrifuge) 5 分鐘後，除去上清液，加入 0.5 ml

LYSIS 緩衝溶液 (50 mM HEPES pH= 7.4, 10 mM EGTA, 40 mM sodium molybdate, 20% glycerol, 6 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, 50 µg/ml TLCK, 50 µg/ml TPCK) , 重新懸浮, 並保持在 4 °C 中。利用 SONICS & MATERIALS INC. VCX 600 (購自 DANBURY, CT. U.S.A.) 將細胞震破。首先, 將 Sonicator 之 TUNE : 調整到 10 ; Amplitude : 調整到 20 % , 用清水以 10 sec/once , 打一次, 再將含有 0.5 ml lysis 緩衝溶液之 sample 以 5 sec/once , 打二次, 加入 5 µl 100 mM PMSF (lysis 緩衝溶液體積的 1/100) , 再打二次。細胞均質液於 4 °C 12,500 rpm (HERMLE z323k Centrifuge)離心 10 分鐘後, 將上清液移至新的微量離心管中, 於 4 °C 100,000 rpm 離心 60 分鐘, 上清液部分與等體積之 2X 樣品緩衝溶液混合(用來偵測 AhR 和 Arnt 蛋白), 沉澱物 (pellet)部分以等體積之 1 X 樣品緩衝溶液混合 (用來偵測 CYP1A1 蛋白)留 50 µl 用來測蛋白量, 再置於 100 °C 沸水中 denature 5 分鐘, 並以 BCA protein assay 定量蛋白量。

(二)西方墨點法

製備 4 %上膠 (1.56 ml upper gel buffer, 0.6 ml 40% acrylamide-bis acrylamide, 120 µl 10% ammonium persulfate, 3.73 ml 蒸餾水, 12 µl TEMED)及 8 %下膠 (2.5 ml lower gel buffer, 2 ml 40% acrylamide-bis acrylamide, 120 µl 10% ammonium persulfate, 5.4 ml 蒸餾水, 20 µl TEMED) 之直立式 mini acrylamide-bis acrylamide gel , 每個 well loading 20 µg 的樣品, 以 120 volt 跑 90 分鐘, 直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完的前 10 分鐘, 準備一張大小恰當的 PVDF membrane , 先用甲醇洗一下 (約 15 秒), 再換成清水振盪 5 分鐘。將膠卸下後, 同時與 PVDF membrane 及兩

片濾紙一起浸在 transfer 緩衝溶液中 (0.31% Tris, 1.44% glycine, 20% methanol) , 振盪 5 分鐘後利用 Bio Rad-Mini Trans-Blot Cell , 將膠上的蛋白轉移到 PVDF membrane 上 (100 volt、 60 分鐘)。將 transfer 好的 PVDF membrane 浸在含 5%脫脂奶粉的 1 X-TTBS 緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.2 % Tween 20, 150 mM NaCl, PH 7.5)中 , 振盪 60 分鐘。再加入本實驗欲觀察之蛋白的一次抗體 : mouse polyclonal anti-AHR 抗體 (Affinity Bioreagent, Golden, Colorado)或 rabbit monoclonal anti-Arnt 抗體 (Dr. R. Pollenz 所贈與, Medical University of South Carolina)1000 X 稀釋 , 4 overnight , 所有一次抗體於第一次使用完後 , 加入 1/100 體積的 2 % sodium azide 保存於 4 , 以便回收再利用。將處理完一次抗體之 PVDF membrane 用含 5%脫脂奶粉 (skim milk)的 1 X-TTBS 緩衝溶液清洗兩次 , 再用 1 X-TTBS 緩衝溶液清洗兩次 , 接著在室溫下用 anti-mouse IgG-HRP conjugated (Santa cruz biotechnology)或 anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (Calbiochem)之二次抗體於室溫下反應 1 小時。接著以含 5%脫脂奶粉的 1 X-TTBS⁺緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.5 % Tween 20, 300 mM NaCl, PH 7.5)清洗兩次 , 再用 1 X-TTBS⁺緩衝溶液清洗兩次。最後用 PBS 緩衝溶液稍微洗一下 , 即可與 E.C.L.呈色劑 (Amersham RPN 2106) 作用約 5-30 分鐘 , 將經過抗體辨識之蛋白影像呈現在 X-光底片 (FUJI medical X-ray film) 上。

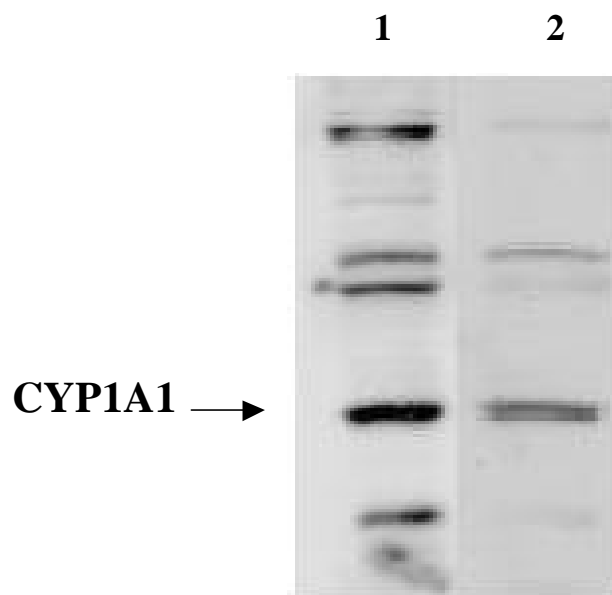
七、免疫組織染色法

首先將組織切片置入 58~59 烘箱約 10 分鐘 , 迅速浸泡於 xylene 中 20 分鐘使組織脫蠟完全 , 再先後浸泡在 100 % 酒精 10 分鐘 , 95 %、 80 %、 75 % 酒精各 5 分鐘 , 最終置入一次水 (dH₂O)中浸泡 30 秒使組織復水。為避免組織中內生性 peroxidase 干擾最後呈色結果 , 所以進一步將組織切片浸

泡在 3 % H₂O₂ 中 15 分鐘。接著置入 0.01M citrate buffer (PH= 6.0)中微波加熱 2~3 次，每次 5 分鐘，待 citrate buffer 冷卻即可將切片浸泡在 PBS 緩衝液中清洗 5 分鐘，此步驟目的是將組織抗原呈現出來。上述為組織切片進行免疫組織染色之前處理步驟。接著以 LSAB, rabbit/mouse, kit/HRP (DAKO CORPORATION Carpinteria, CA)執行免疫組織染色，先以免疫組織筆 (DAKO CORPORATION Carpinteria, CA)將玻片上的組織圈選出來後置入潮溼盒內，再將 mouse polyclonal anti-AHR 抗體 (Affinity Bioreagent, Golden, Colorado)或 rabbit monoclonal anti-Arnt 抗體 (Dr. R. Pollenz 所贈與, Medical University of South Carolina)或 rabbit polyclonal anti-rat CYP1A1 抗體 (CHEMICON, Temecula, CA)以 dilute buffer (DAKO CORPORATION Carpinteria, CA)依 1:60 倍稀釋後，直接將抗體加在組織切片上，作用在 4、16~20 小時。經過 3 次各 5 分鐘浸泡在 1XPBS 緩衝液的清洗步驟，便可加入 biotinylated 的二次抗體，於 37 °C 下作用 20 分鐘，經過 PBS 緩衝液的清洗步驟後，再加入 streptavidin 於 37 °C 下作用 20 分鐘再經過 PBS 緩衝液的清洗步驟後，便可加入 DAB 呈色 (每 1 ml DAB 需額外加入 20 µl 的 3 % H₂O₂)，注意此步驟需避光操作。呈色後的組織切片需以 haematoxylin (MERCK)染背景色，再以活水沖洗玻片約 5~15 分鐘使背景呈藍紫色以方便觀察染色結果。最後，將切片浸泡在 100 % 酒精中脫水，再置入 xylene 浸泡 2 分鐘後便可用阿拉伯膠 ENTELLAN (MERCK)封片保存。組織切片之免疫組織染色結果以 NIKON UFX- 將組織影像攝影保存。

本實驗中曾經選用 anti-human CYP1A1 抗體 (CHEMICON, Temecula, CA)進行免疫組織染色，但可能因抗體本身品質問題，導致無法正確辨識經福瑪琳及石蠟處理過之組織切片中 CYP1A1 蛋白表現位置。故改用

anti-rat CYP1A1 抗體 (CHEMICON, Temecula, CA)進行免疫組織染色，而且經由西方墨點法確認其對人類 CYP1A1 蛋白專一性與 anti-human CYP1A1 抗體 (CHEMICON, Temecula, CA)相同，見附圖一。



附圖一、西方墨點法檢測人類肺癌細胞株 H1355 細胞中 CYP1A1 蛋白量。H1355 於細胞培養至第四天後，處理 10 μ M B[a]P 連續培養 24 小時後，利用西方墨點法檢測細胞株中 CYP1A1 蛋白。lane 1: 用 anti-human CYP1A1 抗體檢測，lane 2: 用 anti-rat CYP1A1 抗體檢測。CYP1A1 分子量為 52 KDa。

八、免疫組織染色結果之判讀

AhR 或 CYP1A1 之免疫組織染色結果之判讀，是經由中山醫學院臨床病理科蔡崇弘醫師、指導教授林嬪嬪副教授、研究生廖永生依照組織切片上 DAB 呈色後之顏色深淺與 positive control (人類攝護腺肥大之組織，見附圖二)比較後，各自獨立判定 AhR 或 CYP1A1 蛋白表現程度。表現程度以 grade 0~3 表示 (人類攝護腺肥大之組織表現量定為 grade 2): grade 0 表示完全不表現、grade 1 表示少量表現、grade 2 表示中等表現、grade 3 表示強烈表現，再進一步將 grade 0 和 grade 1 的組織切片歸類為低量表現；而 grade 2 和 grade 3 則歸為高量表現。Arnt 之免疫組織染色結果之判讀 (以人類攝護腺肥大之組織當 positive control，見附圖二)是計數病人組織切片上之腫瘤細胞數目，每片組織切片數 500~1000 個腫瘤細胞並由中山醫學院臨床病理科張菡醫師重複確認結果，表現程度依照腫瘤細胞計數結果判定：有表現 Arnt 的腫瘤細胞數低於 50% 以下定義為低量表現，高於 50% 以上則定義為高量表現。

附圖二、人類攝護腺肥大之組織中 AhR、Arnt、CYP1A1 之免疫染色結果。

A 為 AhR 於攝護腺肥大組織之免疫染色結果，表現強度為 grade 2；B 為 Arnt 於攝護腺肥大組織之免疫染色結果，表現強度為高量表現；C 為 CYP1A1 於攝護腺肥大組織之免疫染色結果，表現強度為 grade 2。放大倍數均為 200 倍。

九、統計分析

Aryl hydrocarbon hydroxylase assay (AHH)及細胞毒性實驗結果皆經由三次以上個別的實驗得到平均值及標準差，而量化的結果經由 Student' t t-test 加以分析，並檢測其差異性。Student' s t-test 主要是在分析兩組間的差異性，P 值小於 0.05 代表具有統計上的意義。

Immunohistochemistry (IHC)實驗結果經由 Fisher' s exact test 加以分析，以檢測其差異性。Fisher' s exact test 為卡方檢定分析方法之一，其優點為可校正因樣本數過小所可能造成的統計誤差，同樣地 P 值小於 0.05 代表具有統計上的意義。而複合式邏輯回歸分析 (multivariate logistic regression) 則用以控制性別與組織型態 (histology)因素。

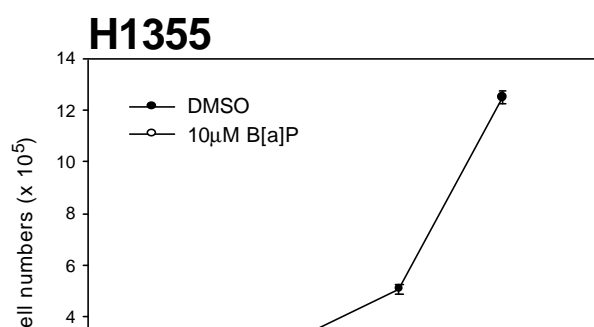
第三章、實驗結果與討論

第一節 處理 B[a]P 對人類肺癌細胞株 H23、H1355 和 H226 細胞生長之影響

PAHs 是一種廣泛分布於環境中的污染物，包括有機物不完全燃燒、香菸煙霧懸浮微粒、食用油加熱所生成的油煙，而 B[a]P 則為其主要成分之一，目前已有研究顯示 B[a]P 是一種肺致癌物。故本實驗利用三株來源不同的人類肺癌細胞株，H23、H1355 和 H226 來比較 B[a]P 對此三株細胞生長之影響。其中 H23 和 H1355 為人類肺腺癌細胞株，而 H226 為人類肺鱗狀細胞癌細胞株。首先比較 H23、H1355 和 H226 細胞對 B[a]P 敏感性的差異。將 H23、H1355 和 H226 細胞，細胞密度分別為 5.8×10^4 、 4.0×10^4 、 4.0×10^4 個細胞種入 6-well plate 中，培養 24 小時後，再加入 DMSO 或 $10 \mu\text{M}$ B[a]P，每隔兩天更換一次培養液再重新加入新的 B[a]P，分別將培養 1、2、3、4 天之細胞收下後，再以 trypan blue 染色法測定存活細胞數目。

由圖一結果顯示，H1355 細胞處理 B[a]P 4 天後細胞數已降為對照組的 13.1 %；H23 細胞株細胞數減少為對照組的 51.5 %；但是對 H226 細胞株而言，處理 B[a]P 組與對照組的細胞數較無明顯差異。由上述結果可知處理 B[a]P 會抑制 H23 和 H1355 細胞生長，相較之下 B[a]P 對於 H226

細胞生長之影

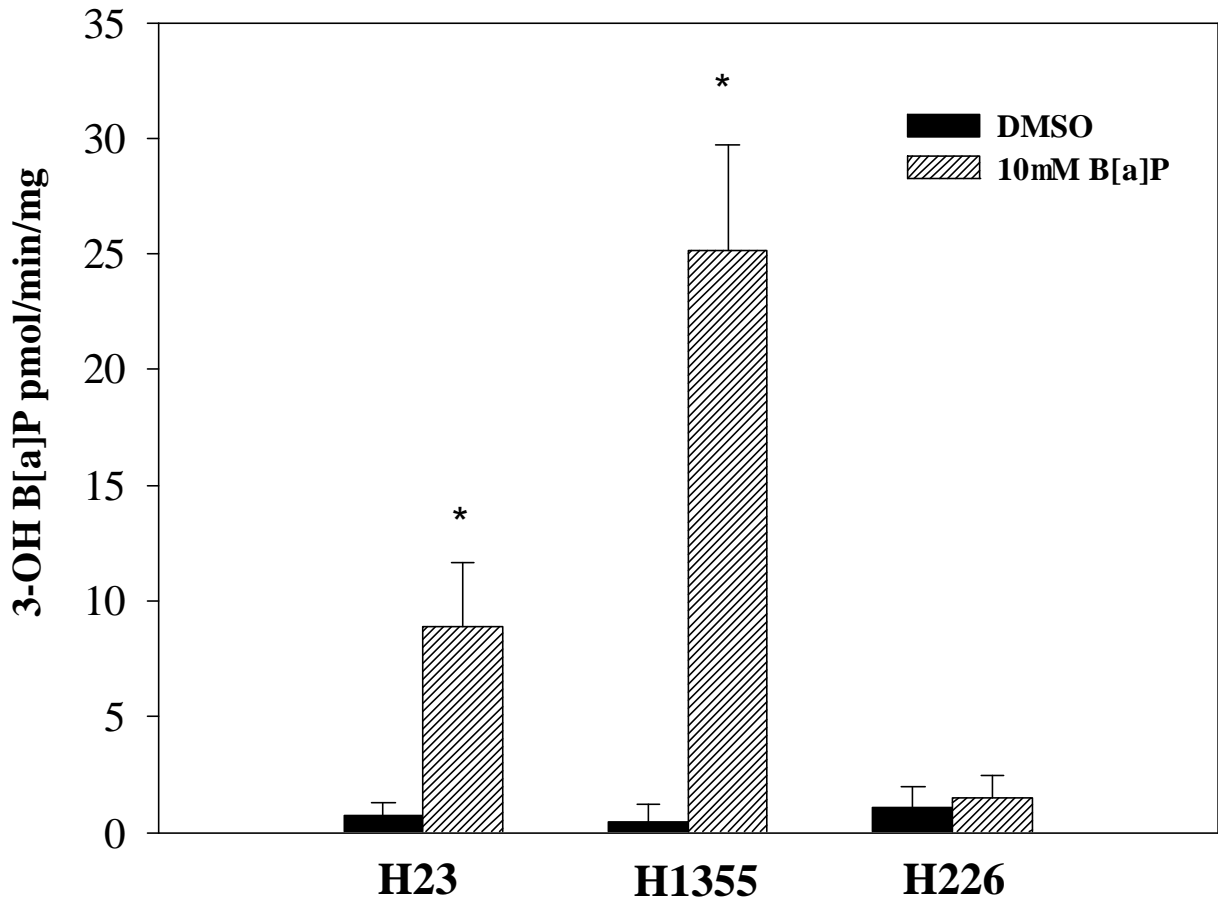


圖一、 處理 B[a]P 對人類肺癌細胞株 H23、 H1355 和 H226 細胞生長之影響。

4.0x10⁴、 4.0x10⁴ 個細胞種入 6-well plate 中，培養 24 小時後，再加入 DMSO 或 10 μ M B[a]P，每隔兩天更換一次培養液再重新加入新的 B[a]P，分別將培養 1、 2、 3、 4 天之細胞收下後，再以 trypan blue 染色法測定存活細胞數目。B[a]P 對三株細胞的生長有不同的影響。處理 B[a]P 會使 H23、 H1355 細胞生長明顯受抑制，但 H226 細胞生長速率相對較不受影響。

第二節、在人類肺癌細胞株中，B[a]P 誘導 CYP1A1 酵素活性之程度

已知 CYP1A1 參與 B[a]P 的代謝活化過程，因此接著以 arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 測定 B[a]P 對 H23、H1355、H226 這三株人類肺癌細胞株 CYP1A1 酵素活性之影響。所以我們將 H23、H1355、H226 處理 10 μ M B[a]P 24 小時後，以 AHH 方法測定 CYP1A1 酵素活性。結果發現，經處理 B[a]P 24 小時後，肺腺癌細胞株 H23 和 H1355 之 CYP1A1 酵素活性均有顯著上升，與對照組相比分別增加 12 及 56 倍（經由 Student's t-test 分析，P 值 $<$ 0.01），而 B[a]P 誘導 H226 細胞株之 CYP1A1 酵素活性極低，僅比對照組增加 1.4 倍（經由 Student's t-test 分析，P 值 $<$ 0.01）（圖二）。由此可知，B[a]P 對這三株人類肺癌細胞株誘導 CYP1A1 酵素活性的能力不同，其中以 H1355 細胞株對 B[a]P 敏感性較高、H23 次之，而 H226 細胞株對 B[a]P 則不敏感。若以組織學上之分類 (histology) 可發現，肺腺癌細胞株 H23 和 H1355 之 CYP1A1 酵素活性受 B[a]P 誘導而有顯著增高；肺鱗狀細胞癌細胞株 H226 則對 B[a]P 則不敏感。



圖二、H23, H1355, H226 細胞株中，B[a]P 誘導 CYP1A1 酵素活性之程度。

將 H23, H1355, H226 細胞株處理 10 μ M B[a]P 24 小時後，以 AHH 方式測定 CYP1A1 酵素活性。結果發現，H23 和 H1355 中，CYP1A1 酵素活性均有顯著上昇，與對照組相比分別增加 12 及 56 倍；而 B[a]P 誘導肺鱗狀細胞癌細胞株 H226 之 CYP1A1 酵素活性極低，僅比對照組增加 1.4 倍（經由 Student's t-test 分析，P 值 < 0.01）。

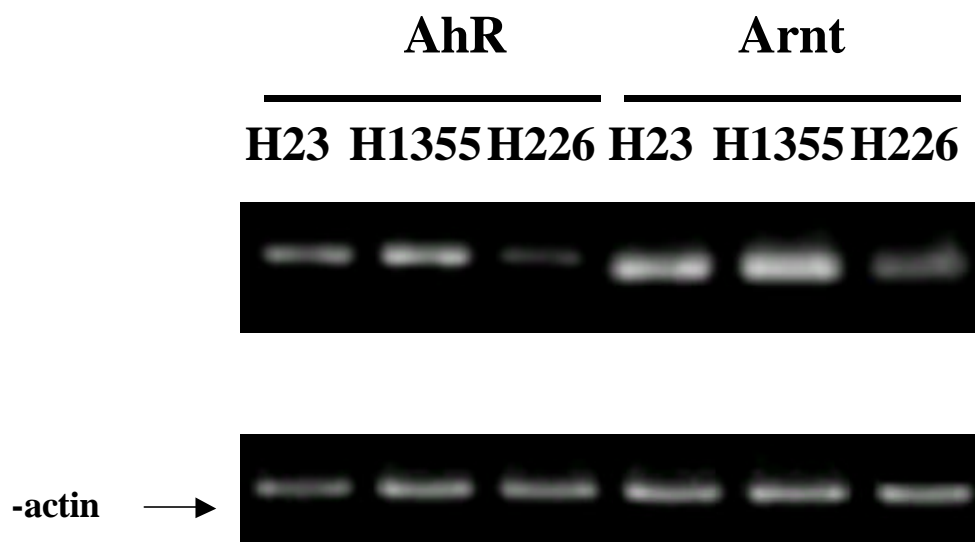
第三節、比較人類肺癌細胞株中，AhR 與 Arnt 之 mRNA 與蛋白之表現量

已知經由 B[a]P 必須經由活化 AhR 與 Arnt, 而誘導 CYP1A1 基因表現 (Bigelow, S. W. et al., 1982)。因此我們進一步比較 AhR 與 Arnt 之 mRNA 與蛋白在 H23、H1355、H226 細胞中的表現程度。

(一) 人類肺癌細胞株中，AhR 與 Arnt 之 mRNA 表現量

H23、H1355、H226 於細胞分盤後培養至第四天，當細胞數目達到 10 cm 培養皿的 9~10 成滿時，分離出 mRNA 進行半定量 RT-PCR 反應，用以測定 AhR 與 Arnt mRNA 表現量 (AhR 的 RT-PCR 產物片段大小為 180 bp，而 Arnt 的 RT-PCR 產物片段大小為 225 bp， β -actin 的 RT-PCR 產物片段大小為 541 bp)。結果如圖三。由結果中可觀察到 H23、H1355、H226 這三株細胞均會表現 AhR 與 Arnt mRNA，且發現在肺腺癌細胞株 H23 及 H 1355 的 AhR mRNA 表現量均較肺鱗狀細胞癌細胞株 H226 為高。而在 Arnt mRNA 表現量方面則與 AhR mRNA 表現情形相似，同樣是在肺腺癌細胞株中 Arnt mRNA 表現量均較肺鱗狀細胞癌細胞株中表現量高。

根據本實驗之結果可知，H23、H1355、H226 三株細胞均會表現 AhR 與 Arnt mRNA，且表現量與 CYP1A1 誘導量成正相關，但仍須進一步檢測 AhR 與 Arnt 蛋白表現情形。



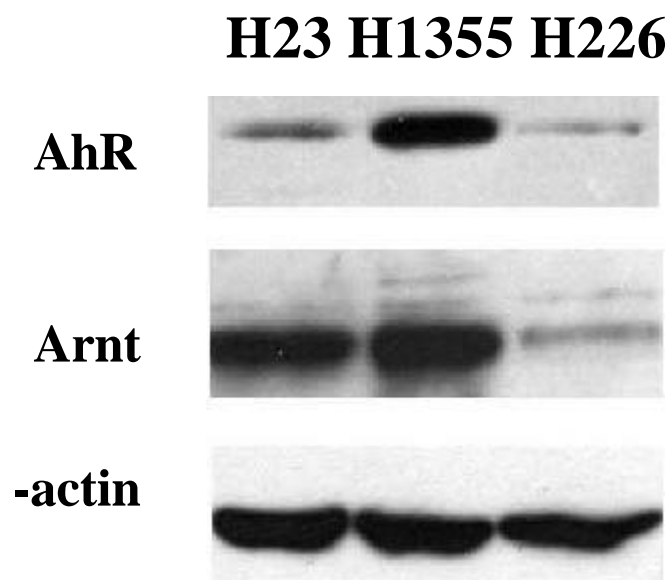
圖三、H23、H1355、H226 細胞株中，AhR 與 Arnt 之 mRNA 表現程度。

H23、H1355、H226 細胞株於細胞分盤後培養至第四天時，分離出 mRNA 進行半定量 RT-PCR 反應，用以測定 AhR 與 Arnt mRNA 表現量。H23、H1355、H226 這三株細胞均會表現 AhR 與 Arnt mRNA，且在 H23 及 H1355 細胞株的 AhR mRNA 表現量均較 H226 細胞株為高，經定量後分別為 H226 的 1.7 及 1.4 倍。而在 Arnt mRNA 表現量方面則與 AhR mRNA 表現情形相似，同樣是 H23 及 H1355 細胞株的 Arnt mRNA 表現量均較 H226 細胞株為高，經定量後分別為 H226 的 1.5 及 1.3 倍。

(二) 人類肺癌細胞株中，AhR 與 Arnt 之蛋白表現量

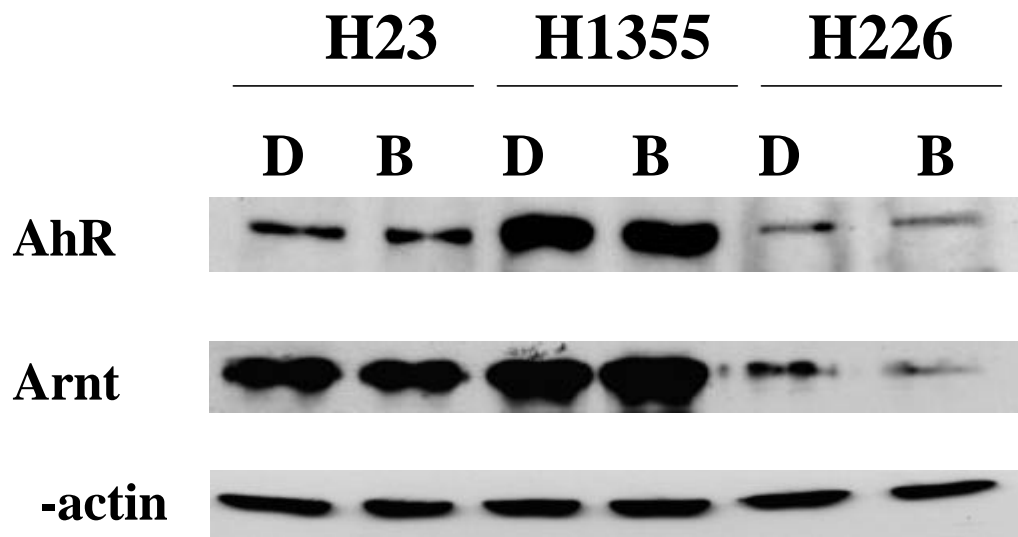
本實驗將進一步探討 AhR 與 Arnt 在此三株細胞的蛋白表現情形，及其與 AhR、Arnt mRNA 和 CYP1A1 酵素活性，B[a]P 抑制細胞生長作用間的相關性。將 H23、H1355、H226 細胞株分別處理或不處理 10 μ M B[a]P 24 小時後，再將細胞萃取液以西方墨點法檢測細胞株中 AhR 與 Arnt 的蛋白表現（人類 AhR 與 Arnt 分子量分別為 110KDa 和 95KDa）。由結果中可發現 AhR 蛋白表現量在兩株肺腺癌細胞中均較肺鱗狀細胞癌細胞株高，其中以 H1355 表現量最高、H23 次之而 H226 的 AhR 相對表現量最低。Arnt 蛋白表現情形與 AhR 相似，較不同的是 H23 和 H1355 Arnt 蛋白量差不多，但明顯較 H226 量多(圖四)；另外亦發現此三株細胞處理 10 μ M B[a]P 後並不會誘導 AhR 與 Arnt 之蛋白表現量(圖五)。

綜合上述之實驗結果 (圖一~五)可知，H23、H1355、H226 三株細胞均會表現 AhR 與 Arnt 之 mRNA 和蛋白，且表現量與 CYP1A1 inducibility (CYP1A1 被誘導量)和細胞生長之抑制作用成正相關。



圖四、H23、H1355、H226 細胞株中，AhR 與 Arnt 之蛋白表現程度。

H23、H1355、H226 細胞萃取液以西方墨點法檢測細胞株中 AhR 與 Arnt 的蛋白表現（人類 AhR 與 Arnt 分子量分別為 110KDa 和 95KDa）。由結果中可發現 AhR 蛋白表現量以 H1355 表現量最高 H23 次之而 H226 的 AhR 相對表現量最低。Arnt 蛋白表現情形與 AhR 相似，較不同的是 H23 和 H1355 Arnt 蛋白量差不多，但明顯較 H226 量多。



圖五、H23、H1355、H226 細胞株中，B[a]P 誘導 AhR 與 Arnt 之蛋白表現程度。

將 H23、H1355、H226 細胞株分別處理 10 μ M B[a]P 及 DMSO 24 小時後，再將細胞萃取液以西方墨點法檢測細胞株中 AhR 與 Arnt 的蛋白表現（人類 AhR 與 Arnt 分子量分別為 110KDa 和 95KDa），由結果中可發現與對照組相比 H23、H1355、H226 細胞處理 10 μ M B[a]P 後並不會誘導增加 AhR 與 Arnt 之蛋白表現量。

第四節、AhR 蛋白在肺癌病人組織中之表現情形

由前面肺癌細胞株的實驗中發現 AhR 與 Arnt 表現量可能與 B[a]P 之細胞毒性有關，而且因組織型態不同而異。因此我們進一步在肺癌病人組織中檢測 AhR 之表現情形。首先以 immunohistochemistry (IHC) 染色法來偵測 AhR 在非肺癌病人組織 (圖六 A-B) 和肺癌病人組織中的表現強度 (圖七 A-B) 及其位置，發現 AhR 在 34 個肺腺癌和 21 個肺鱗狀細胞癌組織切片中，主要表現在支氣管上皮細胞及腫瘤細胞之細胞質中；若依 AhR 表現程度來分類，支氣管上皮細胞的表現強度為 grade 1~2，另外我們也發現有部分 type 肺泡上皮細胞和平滑肌細胞有表現 AhR，強度為 grade 2，而內皮細胞及纖維母細胞則不表現 AhR。在 55 個肺癌病人組織切片中，有一片組織 (病人編號 201) 同時包含有肺腺癌及肺鱗狀細胞癌兩種組織型態，在肺腺癌組織區域的 AhR 表現量為 grade 3，而在正常之肺支氣管上皮細胞和肺鱗狀細胞癌組織區域則相對表現較弱，表現量僅為 grade 1 (見圖八 A-C)。

在本次實驗的 55 位肺癌病人腫瘤組織中，AhR 表現量與年齡、性別、抽煙狀況及其他臨床病理表徵間的相關性，詳見於 Table I。我們發現 AhR 表現量分別與組織型態及性別有高度相關性，P 值分別為 0.013 和 0.002。以組織型態來分：AhR 在肺腺癌組織中表現量明顯較鱗狀細胞癌高，而在性別方面：女性表現高於男性。在 34 個肺腺癌病人組織中有 22 個為 AhR

高表現量約佔 65%，且這 22 個組織中有 17 個來自於女性肺癌病患 (77%)；抽煙狀況及其他臨床病理表徵則與 AhR 表現量無統計上之相關性。此外為了進一步確認組織型態與性別之間的交互影響，所以我們將不同組織型態的病人切片再依性別來分層 (Table)，結果發現肺腺癌病人部分：女性 AhR 為高表現量比例有 93 % 明顯高於男性的 42 %，P 值為 0.003；反觀肺鱗狀細胞癌病人部分，AhR 表現量在性別上並無差異。另外由複合式邏輯回歸分析 (multivariate logistic regression) 亦顯示出，AhR 高表現量主要是因組織型態或性別之個別影響 ($P < 0.01$)，而非導因於組織型態或性別之交互影響所致。

TABLE AhR 在不同臨床表徵的肺癌組織中之表現情形。

	AhR		P-value
	Low	High	
Number of cases	27	28	
Sex			0.002
Male	22	11	
Female	5	17	
Age(years)			0.285
40~63	11	16	
64~83	16	12	
Smoking behavior			0.054
Smoker	14	7	
Non-smoker	13	21	
Histology			0.013
Adenocarcinoma	12	22	
Squamous cell carcinoma	15	6	
Tumor (pT) ¹			0.408
T ₁	4	5	
T ₂	15	19	
T ₃	8	2	
T ₄	0	2	
Nodal involvement(pN) ¹			0.823
N ₀	12	15	
N ₁	6	5	
N ₂	9	8	
Grade ²			0.092
1	2	3	
2	15	22	
3	10	3	
Disease stage ¹			0.432
	10	15	
	3	3	
	14	10	

1 The categories are defined by TNM staining.

2 The categories are distinguished by tumor differentiation.

TABLE AhR 在不同組織型態的男性及女性肺癌組織中之表現情形。

	AhR		P-value
	Low	High	
Number of cases	27	28	
Adenocarcinoma			0.003
Male	11	8	
Female	1	14	
Squamous cell carcinoma			0.354
Male	11	3	
Female	4	3	

第五節、Arnt 蛋白在肺癌病人組織中之表現情形

我們以免疫組織染色檢測了 54 個肺癌病人的組織切片及 5 個非肺癌病人組織 (包括 3 個肺結核、1 個肺氣腫、1 個間質性肺部疾病) 中 Arnt 蛋白的表現情形。Arnt 在非肺癌病人組織 (圖六 C-D) 和肺癌病人組織中的表現強度判定如圖七 C-D。免疫組織染色的結果發現 Arnt 主要表現在支氣管上皮細胞和腫瘤細胞的細胞核中, 部分基質細胞和 type 肺泡上皮細胞亦有表現 Arnt; 而在內皮細胞和平滑肌細胞並無表現 Arnt 蛋白。在病人編號 201 號組織切片中同時包含有肺腺癌及肺鱗狀細胞癌兩種組織型態, 在肺腺癌和肺鱗狀細胞癌組織區域的 Arnt 為高表現量, 而在正常之肺支氣管上皮細胞則相對表現較弱, 屬低表現量 (見圖八 D-F)。在 5 個非肺癌病人的組織中, Arnt 均為低表現量 (即表示正常上皮細胞 Arnt 表現量低於 50%)。在本次實驗的 54 位肺癌病人腫瘤組織中, Arnt 表現量與年齡、性別、抽煙狀況及其他臨床病理表徵間的相關性, 詳見於 Table 。觀察的結果發現, 不論在年齡、性別、抽煙狀況及其他臨床病理表徵等與 Arnt 表現量間均無統計上的差異性。但我們發現在同一個病人組織中 Arnt 表現量在腫瘤細胞中 (n=54) 明顯高於正常的上皮細胞 (n=32)。

TABLE Arnt 在不同臨床表徵的肺癌組織中之表現情形。

	Arnt		P-value
	Low	High	
Number of cases	19	35	
Sex			0.566
Male	10	22	
Female	9	13	
Age(years)			0.566
40~63	9	13	
64~83	10	22	
Smoking behavior			0.257
Smoker	5	15	
Non-smoker	14	20	
Histology			0.139
Adenocarcinoma	9	25	
Squamous cell carcinoma	10	10	
Tumor (pT) ¹			0.201
T ₁	5	3	
T ₂	9	25	
T ₃	4	6	
T ₄	1	1	
Nodal involvement (pN) ¹			0.296
N ₀	11	18	
N ₁	5	5	
N ₂	3	12	
Grade ²			1.000
1	2	4	
2	12	23	
3	5	8	
Disease stage ¹			0.918
I	10	17	
II	2	3	
III	7	15	
IV			<0.001
Neoplastic cells(54)	19	35	
Non-neoplastic cells(32)	28	4	

1 The categories are defined by TNM staining.

2 The categories are distinguished by tumor differentiation.

圖六、非肺癌病人肺部組織中 AhR、Arnt 之免疫染色結果。

A、C 為非肺癌成人肺部組織；B、D 為非肺癌幼兒肺部組織。A-B 為 AhR 之免疫染色結果，A 表現強度為 grade 1, B 為 grade 0；C-D 為 Arnt 之免疫染色結果，C、D 表現強度均為低表現量。放大倍數均為 200 倍。

第六節、CYP1A1 蛋白在肺癌病人組織中之表現情形

本實驗中總共檢測了 55 個肺癌病人腫瘤組織切片中 CYP1A1 蛋白的表現情形。CYP1A1 在肺癌病人組織中的表現強度判定如圖七 E-F。免疫組織染色的結果顯示，CYP1A1 主要表現於支氣管上皮細胞和腫瘤細胞之細胞質中，在少數病人的組織切片中 type 肺泡上皮細胞也發現有 CYP1A1 的表現。在病人編號 201 號組織切片中同時包含有肺腺癌及肺鱗狀細胞癌兩種組織型態，在肺腺癌和肺鱗狀細胞癌組織區域的 CYP1A1 表現量為 grade 2，而在正常之肺支氣管上皮細胞則相對表現較弱，表現量僅為 grade 1 (見圖八 G-I)。在 CYP1A1 表現量之判定上，因與 AhR 同樣表現於細胞質位置所以判定方式也與 AhR 相同，將其區分為高 CYP1A1 表現量與低 CYP1A1 表現量。在本次實驗的 55 位肺癌病人腫瘤組織中，AhR 表現量與年齡、性別、抽煙狀況及其他臨床病理表徵間的相關性，詳見於 Table 。由結果顯示，在 34 個肺腺癌病人中有 22 個為高 CYP1A1 表現量約佔 65 % ；而 21 個肺鱗狀細胞癌病人組織中僅 6 個為高 CYP1A1 表現量約佔 29 % (Table)。CYP1A1 在肺腺癌病人腫瘤組織中表現量明顯高於鱗狀細胞癌(P=0.013)。然而抽煙、性別、年齡及其他臨床病理表徵均與 CYP1A1 表現量無統計上之相關性。

TABLE CYP1A1 在不同臨床表徵的肺癌組織中之表現情形。

	CYP1A1		P-value
	Low	High	
Number of cases	27	28	
Sex			0.412
Male	18	15	
Female	9	13	
Age(years)			0.171
40~63	8	14	
64~83	19	14	
Smoking behavior			0.171
Smoker	13	8	
Non-smoker	14	20	
Histology			0.013
Adenocarcinoma	12	22	
Squamous cell carcinoma	15	6	
Tumor (pT) ¹			0.100
T ₁	2	6	
T ₂	20	15	
T ₃	3	7	
T ₄	2	0	
Nodal involvement (pN) ¹			0.594
N ₀	13	16	
N ₁	7	4	
N ₂	7	8	
Grade ²			0.232
1	1	5	
2	18	18	
3	8	5	
Disease stage ¹			0.642
	12	15	
	4	2	
	11	11	

1 The categories are defined by TNM staging.

2 The categories are distinguished by tumor differentiation.

圖七、人類肺癌組織中 AhR、Arnt、CYP1A1 之免疫染色結果。

A-B 為 AhR 高量表現之免疫染色結果；C-D 為 Arnt 高量表現之免疫染色結果；E-F 為 CYP1A1 高量表現之免疫染色結果。A、C、E 為人類肺腺癌組織；B、D、F 為人類肺鱗狀細胞癌組織。放大倍數均為 200 倍。

圖八、病人編號 201 號組織切片中 AhR、Arnt、CYP1A1 之免疫染色結果。

A-C 為 AhR 之免疫染色結果，A 表現強度為 grade 3 B 和 C 均為 grade 1；D-F 為 Arnt 之免疫染色結果，D 和 F 表現強度均為高表現量、E 為低表現量；G-I 為 CYP1A1 之免疫染色結果，G 和 I 表現強度均為 grade 2、H 為 grade 1。A、D、G 為人類肺腺癌組織；B、E、H 為人類正常肺上皮細胞；C、F、I 為人類肺鱗狀細胞癌組織。放大倍數均為 200 倍。

第七節、AhR、Arnt 及 CYP1A1 蛋白表現量之相關性

已知 CYP1A1 之基因表現是由 PAS 類轉錄因子-AhR、Arnt 所調控 (Whitlock, et al., 1999)。而且由先前的免疫結果發現，在肺腺癌病人腫瘤組織中，AhR 與 CYP1A1 的表現量均明顯高於肺鱗狀細胞癌 (Table 、Table)。所以我們進一步分析肺腺癌病人中 CYP1A1 及其調控因子 AhR、Arnt 蛋白表現之相關性。由於有部分病人的組織切片數量不足三片，所以經交叉比對之後，總共有 49 個肺癌病人的組織切片均有檢測 AhR、Arnt 及 CYP1A1 蛋白表現量，其中共有 31 個病人為肺腺癌。

在本次實驗的 31 個肺腺癌病人的腫瘤組織中，AhR、Arnt 及 CYP1A1 蛋白表現量之相關性詳見於 Table 。AhR 與 CYP1A1 的蛋白表現量雖然並無統計上之相關性，但其 $P=0.056$ 為接近統計意義的區域 ($P<0.05$)。然而當我們進一步依抽煙習慣將肺腺癌病人細分為有抽煙習慣與無抽煙習慣的兩個亞族群後，發現在不抽煙的肺腺癌病人中，AhR 與 CYP1A1 蛋白表現量有正相關 ($P=0.004$)。然而在 Arnt 與 CYP1A1 蛋白表現量之間，並無統計上的相關性。另外，在肺鱗狀細胞癌部分，AhR、Arnt 及 CYP1A1 蛋白表現量之間並無相關性。

TABLE AhR、Arnt 及 CYP1A1 於肺腺癌組織中表現量之相關性。

	AhR		P-value	Arnt		P-value
	Low	High		Low	High	
Low CYP1A1	7	4	0.056	3	8	1.000
High CYP1A1	5	15		5	15	
Nonsmoker			0.004			1.000
Low CYP1A1	5	1		2	4	
High CYP1A1	2	14		5	11	
Smoker			0.524			1.000
Low CYP1A1	2	3		1	4	
High CYP1A1	3	1		0	4	

第四章、綜合討論

(一)AhR、Arnt 在人類肺部組織的表現位置及其蛋白量

本篇研究最重要的發現是，我們以免疫組織染色偵測到 AhR 及 Arnt 這兩個 PAS 類轉錄因子在人類肺部的表現情形。而且依據我們所知，目前也尚未有文獻發表過關於 AhR 及 Arnt 在肺部的蛋白表現量及其位置之報導。由我們的研究結果顯示肺癌病人組織中，AhR 及 Arnt 主要表現於支氣管上皮細胞及腫瘤細胞中，且 AhR 表現於細胞質，Arnt 表現於細胞核中，此結果與 AhR 及 Arnt 在人類攝護腺組織中蛋白表現情形相似 (Kashani, et al., 1998)。另外 AhR 在平滑肌細胞也有表現，而在部分肺癌病人組織中，Type 肺泡上皮細胞亦有表現 AhR 和 Arnt。已知 CYP1A1 參予代謝活化 PAHs 類化合物 (Shimada, et al., 1992)且 CYP1A1 基因表現受到 AhR 和 Arnt 所調控 (Whitlock, et al., 1996)，所以我們同時也檢測肺癌病人組織中 CYP1A1 蛋白的表現情形，免疫組織染色結果發現 CYP1A1 主要表現於支氣管上皮細胞和腫瘤細胞的細胞質中，部分 type 肺泡上皮細胞也有表現 CYP1A1，此結果與先前其他學者已發表之文獻結果相符 (Anttila, et al., 1991 ; Saarikoski, et al., 1998)。綜合上述結果證實，AhR、Arnt 和 CYP1A1 在人類肺癌病人組織中表現位置是相似的，主要表現於肺支氣管上皮細胞和腫瘤細胞中。

(二) AhR 高量表現可能會促使腫瘤組織同樣表現高量 CYP1A1 蛋白

Anttila (1991)和 Saarikoski (1998)等學者之文獻指出，在有抽煙習慣的肺癌病人組織中，肺腺癌病人組織 CYP1A1 mRNA (以 in situ hybridization 方法檢測)和蛋白表現量 (以 immunohistochemistry 方法檢測)均高於肺鱗狀細胞癌和小細胞癌。這與我們的研究結果是相符合的，由 Table 之免疫染色結果指出，CYP1A1 蛋白同樣在肺腺癌病人組織表現量高於肺鱗狀細胞癌 已知 CYP1A1 基因表現受 AhR 所調控，由 Table 的結果也發現 AhR 蛋白在肺腺癌病人組織表現量較高，而且在非抽煙的肺腺癌組織中 AhR 表現量與 CYP1A1 成正相關 (Table)。細胞實驗方面也發現不同的肺癌細胞株其 AhR、Arnt 有不同程度的表現量，且在人類肺腺癌細胞株 H23H、1355 中，CYP1A1 inducibility 及 AhR、Arnt 蛋白和 mRNA 表現量高於肺鱗狀細胞癌細胞株 H226 (圖二、三、四、五)，因此我們認為 AhR 可能是影響 CYP1A1 表現的主要因子。另外，已有研究指出 CYP1A1 *Msp* I 同質基因變異型會增加 CYP1A1 被誘導能力，因此我們同時也考慮本次實驗病人 CYP1A1 蛋白高量表現是否與 CYP1A1 *Msp* I 基因多型性有關，故進一步比對由王秀仁學姊所做之 CYP1A1 *Msp* I 基因多型性實驗數據 (n = 24)，結果發現 CYP1A1 *Msp* I 基因多型性與 CYP1A1 蛋白表現量無關 (Table)。由上述之結果推測，CYP1A1 在不同組織型態的肺癌病人腫瘤

組織中 (包括肺腺癌、肺鱗狀細胞癌)會有不同程度的表現量，可能是導因於CYP1A1的轉錄因子—AhR在這些肺癌細胞中有不同的表現量所致而非受到 CYP1A1 *Msp* I 基因多型性之影響，亦即 AhR 高量表現，可能會促使腫瘤組織同樣表現高量 CYP1A1 蛋白。

Table - 肺癌病人 CYP1A1 *Msp* I 基因多型性與 CYP1A1 蛋白表現量之
相關性

病人編號	CYP1A1 <i>Msp</i> I	CYP1A1表現量
49	H	high
78	H	high
86	H	high
96	H	high
124	H	high
125	H	high
148	H	high
268	M	high
244	W	high
52	H	low
58	H	low
64	H	low
91	H	low
104	H	low
135	H	low
252	H	low
260	H	low
69	M	low
7	W	low
62	W	low
70	W	low
73	W	low
99	W	low
130	W	low

1. W、H、M 分別代表 W: Wild type H: Heterozygous type M: Mutant type
2. CYP1A1 *Msp* I 實驗部分為王秀仁學姊所做之實驗數據。

(三)對台灣女性而言，AhR 高表現量可能會增加肺癌易感性(susceptibility)

已有多篇文獻證實香菸煙霧會誘導人類肺部組織中 CYP1A1 的基因表現 (Pasquini, et al., 1988 ; Mclemore, et al., 1990 ; Anttila, et al., 1991) , 且停止抽菸後CYP1A1 酵素活性會回復到基礎表現量 (Petruzzelli, et al., 1988) 甚至停止抽菸 6 個月後便無法以 Northern blotting 測得 CYP1A1 mRNA (Mclemore, et al., 1990)。然而，由我們的實驗結果顯示肺癌病人腫瘤組織中，抽菸與否和 CYP1A1 蛋白表現量並無統計上之相關性 (Table)。本實驗的肺腺癌病人腫瘤組織 CYP1A1 有較高之表現量，但有趣的是在這 22 位 CYP1A1 表現量高之肺腺癌病人中有 12 位為女性患者 (55 %)且全部是無抽菸習慣 (Table)。台灣女性肺癌患者主要是罹患肺腺癌 (50 %)，但台灣婦女的抽菸率低僅佔 3~4 % (Koo, et al., 1990),故這些女性患者絕大多數為非抽菸患者，也因此台灣婦女可能經由其他途徑暴露到來自環境中的 PAHs 類化合物，例如：廚房中烹調時所產生之油煙 (Chiang, et al., 1999 ; Gao, et al., 1996 ; Shields, et al., 1995 ; Li et al., 1994)、二手菸 (Wen, et al., 1994)、職業性暴露 (Chen, et al., 1995)等，而使得台灣非抽菸女性肺癌患者表達高量 CYP1A1 蛋白。另外亦有多篇流行病學研究指出，與男性相較之下，女性有較高之肺癌易感性 (susceptibility) (Engeland, et al., 1996; Zang and Wynder, 1996)，並且發現有抽菸之女性肺癌患者較同為抽煙之男性肺

癌患者，有較高的 DNA 鍵結量 (DNA adducts)、CYP1A1 蛋白表現量及 P53 發生 G:C to T:A 的突變機率 (Ryberg, et al., 1994 ; Kure, et al., 1996 ; Mollerup, et al., 1999)。另外，在李輝老師尚未發表之研究結果顯示，台灣非抽煙之女性肺癌患者的 DNA adducts 量亦高於男性非抽煙者。而且由我們的研究結果也證實女性肺癌患者 AhR 蛋白表現量高於男性 (Table)。因此我們推測對台灣女性而言，AhR 高表現量可能會增加肺癌易感性，然而要證實此一假設可能還需要更多的證據支持。

Table - CYP1A1 在不同抽煙狀態的男性及女性肺腺癌組織中之表現情形。

	CYP1A1	
	Low	High
Number of cases	12	22
Male		
Smoker	4	4
Nonsmoker	5	6
Female		
Smoker	1	0
Nonsmoker	2	12

(三)AhR、Arnt 表現量可能會受到其他因素所影響

AhR、Arnt 的表現量可能會受到其他因素所影響,例如荷爾蒙、細胞癌化過程及基因多型態。由最近的文獻報告指出, AhR 表現量可能與荷爾蒙有關 (Kuchenhoff, et al.,1999 ; Chaffin, et al., 1999)。Kuchenhoff 等學者以 *in situ hybridization* 和 *immunohistochemistry* 方法偵測到 AhR 在人類子宮內膜的表現情形,發現 AhR 表現量與人類女性正常月經週期有關,即在月經前期 (0-10 天) AhR 表現量會逐漸增加直到排卵期 (11-14 天)達到最大表現量,隨後 AhR 表現量又逐漸減少 (15-28 天)。Chaffin 等學者則發現恆河猴的 Granulosa 細胞,會受到複合性促性腺激素 (FSH-follicle stimulating hormone、LH-luteinizing hormone)所刺激而誘導增加 AhR 之 mRNA 表現量 (以 RT-PCR 測得)。由上述學者的研究結果推測, AhR 表現量可能會受到女性生理週期之荷爾蒙所調控。而 Kaiser 等學者 (1996)也證實人類肺部腫瘤組織中有表現性荷爾蒙受器 (sex steroid hormone receptor),因此在女性肺部組織中,性荷爾蒙可能經由類似的方式調控 AhR 表現量。另外雖然我們對於 AhR 的內生性配基為何至今仍不清楚,但已知 AhR 的外來配基 (ligand)如 B[a]P、TCDD、3-MC 等均是由多個苯環所形成的多環芳香烴類化合物,就化學結構上而言與同樣由多個苯環所形成之 steroid hormone 相似,故女性荷爾蒙及其代謝物也可能因與 AhR 配基結構上之相似性而活化 AhR 蛋白。

目前有關調控 AhR、Arnt 表現量的文獻並不多，然而 Spink 等學者 (1998) 發現將一種已知 tumor promoter, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 處理人類乳癌細胞株 MCF-7 後，會誘導 AhR mRNA 表現量增加；而 Hayashi 等學者 (1994) 將 TPA 處理 promyelocytic HL60 細胞也有相同之結果。另外由我的實驗結果中也發現 (Table) 在同一個肺癌病人組織中，Arnt 在腫瘤細胞的蛋白表現量明顯高於正常細胞。因此我們推測細胞癌化過程中 AhR 和 Arnt 表現量會改變，而使得癌細胞大量表現 AhR 和 Arnt。

另外基因多型性也可能是導致 AhR、Arnt 和 CYP1A1 在個體間表現有所差異的因素。Smart 和 Daly 兩位學者 (2000) 在 30 個非抽煙健康白種人的研究中證實，AhR 基因多型性與 CYP1A1 inducibility 成正相關。然而由 Kawajiri 等學者 (1995) 在針對日本人的研究，則無發現 AhR 基因多型性與 CYP1A1 inducibility 或肺癌發生率有相關性，這可能是因 Kawajiri 等學者的研究對象中同時包含有抽煙及非抽煙者，因此可能造成基礎 CYP1A1 酵素活性量上升所致。人類 Arnt 之基因多型性位置已由 Cao 等學者發現 (2000)，其位於 Arnt 基因 codon 511 位置發生 A to C mutation 造成轉譯出的胺基酸由 Asn 變為 Asp，但目前對於 Arnt 基因型與表現型之相關性仍不清楚。由上述文獻之研究結果推測，AhR、Arnt 的表現量可能會受到其他因素所影響，例如荷爾蒙、細胞癌化過程及基因多型態。

(四)肺周邊腫瘤組織表達高量 CYP1A1 蛋白之可能原因

根據流行病學研究顯示，CYP1A1 被誘導量與肺癌易感性成正相關性，即 CYP1A1 被誘導程度高者罹患肺癌之機率較高。且有許多研究顯示肺癌的發生與暴露環境中的致癌物有關，例如多環芳香烴類化合物 (PAHs)。學者普遍認為抽菸會誘導 CYP1A1 mRNA 及蛋白表現量增加，且與形成肺鱗狀細胞癌有關 (McLemore et al., 1990 ; Anttila et al., 1991 ; Anttila et al., 1992 ; Gazdar et al., 1997)，但本實驗結果卻發現大部分之肺腺癌病人腫瘤組織會表現高量 CYP1A1 蛋白 (65%)而肺鱗狀細胞癌則僅 29% 病人 CYP1A1 蛋白高量表現。可能的原因是 AhR 在肺腺癌腫瘤組織中表現量高，故雖然肺腺癌好發於支氣管末梢發生且多為於肺部周邊，但仍可能經由血液循環將環境中的 PAHs 散佈至肺周邊組織，而導致 CYP1A1 蛋白大量表現；反之，雖然肺鱗狀細胞癌好發於大型支氣管但因 AhR 在肺鱗狀細胞癌腫瘤組織中表現量低，故縱使有較多機會暴露到 PAHs 仍無法使 CYP1A1 蛋白大量。另外二手菸也可能是造成 PAHs 有較多機會散佈至肺周邊組織的原因之一，這是因為抽菸者在抽菸行為時，並不會將香菸煙霧吸入肺部深處而僅是停留於肺部淺層甚至口腔中，然而當人們暴露於二手菸環境時往往會不自覺地將空氣中包含的二手菸煙霧，以正常的呼吸動作將其吸入肺部較深處的終端細支氣管或肺泡等處，最後造成肺周邊組織中

CYP1A1 蛋白大量表現。

我們的研究已證實在不同型態的肺癌細胞株會有不同之 AhR、Arnt 表現量及 CYP1A1 inducibility，故未來將近一步探討造成 AhR、Arnt 表現量及 CYP1A1 inducibility 不同之機轉是否導因於 AhR、Arnt 蛋白發生 mutation 所致，亦或是 AhR、Arnt 之基因型影響表現型所致，這些都是將來可進一步研究的方向。最終藉由研究 AhR、Arnt 和 CYP1A1 與台灣肺癌之相關性，來探討 PAH 在台灣肺癌中所可能扮演的角色，並期望將來能更有效地預防台灣地區肺癌的發生，且更準確地找出台灣地區罹患肺癌之高危險群。

第五章、參考文獻

- Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A. M., Petruzzelli, S., Giuntini, C. and Bartsch, H. (1992) An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Research* 52:6248-53.
- Anttila, S., Hietanen, E., Vainio, H. Camus, A. M., Gelboin, H. V., Park, S. S., Heikkila, L., Karjalainen, A. and Bartsch, H. (1991) Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P450IA in lung cancer patients. *International Journal of Cancer* 47:681-5.
- Barbieri, O., Ognio, E., Rossi, O., Astigiano, S. and Rossi, L. (1986) Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in Swiss mice. *Cancer Research* 46:94-8.
- Bartsch, H., Petruzzelli, S., DeFlora, S., Hietanen, E., Camus, A. M., Castegnaro, M., Alexandrov, K., Rojas, M., Saracci, R. and Giuntini, C. (1992) Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case-control multicenter study on lung cancer patients. *Environmental Health Perspectives* 98:119-24.
- Bigelow, S. W. and Nebert, D. W. (1982) The Ah regulatory gene product. Survey of nineteen polycyclic aromatic compounds' and fifteen benzo[a]pyrene metabolites' capacity to bind to the cytosolic receptor. *Toxicology Letters* 10:109-18.
- Brooks, R. A., Gooderham, N. J., Edwards, R. J., Boobis, A. R. and Winton, D. J. (1999) The mutagenicity of benzo[a]pyrene in mouse small intestine. *Carcinogenesis* 20:109-14.
- Cao, H. and Hegele, R. A. (2000) Human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator gene (ARNT) D/N511 polymorphism. *Journal of Human Genetics* 45:92-3.
- Carver, L. A., Jackiw, V. and Bradfield, C. A. (1994) The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *Journal of Biological Chemistry* 269:30109-12.

- Cascorbi, I., Brockmoller, J. and Roots, I. (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Research* 56:4965-9.
- Cavalieri, E. L. and Rogan, E. G. (1992) The approach to understanding aromatic hydro-carbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology Therapy* 55:183-190.
- Chaffin, C. L., Stouffer, R. L. and Duffy, D. M. (1999) Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 140:4753-60.
- Chang, C. Y., Riley, D. J., Lee, E. Y. and Lee, W. H. (1993) Quantitative effects of the retinoblastoma gene on mouse development and tissue-specific tumorigenesis. *Cell Growth & Differentiation* 4:1057-64.
- Chen, J. Q., Strom, A., Gustafsson, J. A. and Morgen, E. T. (1995) Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2CII by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2CII promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Molecular Pharmacology* 47: 940-947.
- Chen, R., Wei, L. and Chen, R. L. (1995) Lung cancer mortality update and prevalence of smoking among copper miners and smelters. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 21:513-6.
- Cherpillod, P. and Amstad, P. A. (1995) Benzo[a]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Molecular Carcinogenesis* 13:15-20.
- Chiang, T. A., Wu, P. F. and Ko, Y. C. (1999) Identification of carcinogens in cooking oil fumes. *Environmental Research* 81:18-22.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-9.
- Crofts, F., Taioli, E., Trachman, J., Cosma, G. N., Currie, D., Toniolo, P. and Garte, S. J. (1994) Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis*. 15:2961-3.

- d'Errico, A., Taioli, E., Chen, X. and Vineis, P. (1996) Genetic metabolic polymorphisms and the risk of : a review of the literature. *Biomarkers* 1: 149-173.
- Denison, M., S., Fisher, J. M. and Whitlock, J. P. Jr. (1988) The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *Journal of Biological Chemistry* 263: 17221-17224.
- Dolwick, K. M., Schmidt, J. V., Carver, L. A., Swanson, H. I. and Bradfield, C. A. (1993) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Molecular Pharmacology* 44:911-7.
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O. Funae, Y. and Fujii-Kuriyama Y. (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 184:246-53.
- Engeland, A. (1996) Trends in the incidence of smoking-associated cancers in Norway, 1954-93. *International Journal of Cancer* 68:39-46.
- Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. (1996) Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140:173-179.
- Fung, J., Thomas, P. E. and Iba, M. M. (1999) Cytochrome P450 1A1 in rat peripheral blood lymphocytes: inducibility in vivo and bioactivation of benzo[a]pyrene in the Salmonella typhimurium mutagenicity assay in vitro. *Mutation Research* 438:1-12.
- Gao, Y. T. (1996) Risk factors for lung cancer among nonsmokers with emphasis on lifestyle factors. *Lung Cancer* 14 Suppl 1:S39-45.
- Garcia-Closas, M., Kelsey, K. T., Wiencke, J. K., Xu, X., Wain, J. C. and Christiani, D. C. (1997) A case-control study of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1, cigarette smoking and lung cancer susceptibility. *Cancer Causes Control* 8:544-53.
- Gazdar, A. F. and Minna, J. D. (1997) Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 89:1563-5.
- Geroge, S. G., Malins, D. C. and Ostrander, G. K. (1994) Enzymology and molecular biology of phase xenobiotic-conjugating enzymes in fish.

In Aquatic Toxicology. New York, U.S.A. 37-85.

- Hakkola, J., Pasanen, M., Pelkonen, O., Hukkanen, J., Evisalmi, S., Anttila, S., Rane, A., Purkunen, R., Saarikoski, S., Tooming, M. and Raunio, H. (1997) Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18:391-397.
- Harris, C. C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Research* 51:5023s-5044s.
- Hayashi, S., Watanabe, J., Nakachi, K., Eguchi, H., Gotoh, O. and Kawajiri, K. (1994) Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis* 15:801-6.
- Hazardous Substances Data Bank. (1988) National Library of Medicine. National Toxicology Program, Bethesda, MD. December 5.
- Hecht, S. S., Isaacs, S. and Trushin, N. (1994) Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene: a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 15:2721-5.
- Hoffer, A., Chang, C. Y. and Puga, A. (1996) Dioxin induces transcription of fos and jun gene by Ah receptor-dependent and-independent pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology* 141:238-247.
- Hoffman, E. C., Reyri, I. I., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A. and Hankinson, P. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958.
- IARC (1987) Overall evaluations of carcinogenicity : an updating of IARC monographs Volumes 1-42. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (suppl. 7)IARC, Lyon.
- Israel, D. I. and Whitlock, J. P. Jr. (1984) Regulation of cytochrome P-450 gene transcription by 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin in wild type and variant mouse hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 259: 5400-5402.
- Itoh, N., Jobo, K., Tsujimoto, K., Ohta, M. and Kawasaki, T. (1993) Two truncated forms of rat insulin receptor-related receptor. *Journal of*

Biological Chemistry 268:17983-6.

- Iwagawa, M., Maeda, T., Izumi, K., Otsuka, H., Nishifuji, K., Ohnishi, Y. and Aoki, S. (1989) Comparative dose-response study on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene and benzo[a]pyrene in F344 rats. *Carcinogenesis* 10:1285-90 .
- Jeffrey, A. M., Jennette, K. W., Blobstein, S. H., Weinstein, I. B., Beland, F. A., Harvey, R. G., Kassai, H., Miura, I. and Nakanishi, K. (1976) Benzo[a]Pyrene-nucleic acid derivative found in vivo : structure of a Benzo[a]Pyrene-tetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *Journal of American Chemistry Society* 98: 5714-5715.
- Kaiser, U., Hofmann, J., Schilli, M., Wegmann, B., Klotz, U., Wedel, S., Virmani, A. K., Wollmer, E., Branscheid, D., Gazdar, A. F. and Havemann, K. (1996) Steroid-hormone receptors in cell lines and tumor biopsies of human lung cancer. *International Journal of Cancer* 67:357-64.
- Kashani, M., Steiner, G., Haitel, A., Schaufler, K., Thalhammer, T., Amann, G., Kramer, G., Marberger, M. and Scholler, A. (1998) Expression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in fetal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* 37:98-108.
- Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N. and Watanabe, J. (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Letters* 263(1):131-3.
- Kawajiri, K., Watanabe, J., Eguchi, H., Nakachi, K., Kiyohara, C. and Hayashi S. (1995) Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer. *Pharmacogenetics* 5:151-8.
- Kellermann, G., Shaw, C. R. and Luyten-Kellerman, M. (1973) Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *New England Journal of Medicine* 289:934-7.
- Kiyohara, C., Hirohata, T. and Inutsuka, S. (1996) The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYPIA1 gene. *Japanese Journal of Cancer Research* 87:18-24.
- Koo, L. C. and Ho, J. H. (1990) Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *International Journal of Epidemiology* 19

Suppl 1:S14-23.

- Kouri, R. E., McKinney, C. E., Slomiany, D. J., Snodgrass, D. R., Wray, N. P. and McLemore T. L. (1982) Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Research* 42:5030-7.
- Kuchenhoff, A., Seliger, G., Klonisch, T., Tscheudschilsuren, G., Kaltwasser, P., Seliger, E., Buchmann, J. and Fischer, B. (1999) Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium. *Fertility & Sterility* 71:354-60.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceeding of National Acadenuc Science USA* 93:5925-30
- Kure, E. H., Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H., Skaug, V., Baera, R. and Haugen A. (1996) p53 mutations in lung tumours: relationship to gender and lung DNA adduct levels. *Carcinogenesis* 17:2201-5.
- Lee, H., Lin, T. L., Shieh, R. L. and Bian, S. S. (1994a) Mutagenicity of airborne particulates from combustion of electric cables in a waste metal retrieval area. *Mutation Research* 324:77-84.
- Lee, H., Su, S. Y., Liu, K. S. and Chou, M. C. (1994b) Correlation between meteorological conditions and mutagenicity of airborne particulate samples in a tropical monsoon climate area from Kaohsiung city, Taiwan. *Environmental & Molecular Mutagenesis* 23:200-207.
- Li, H., Ko, H. P. and Whitlock, J. P. (1996) Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *Journal of Biological Chemistry* 271:21262-7.
- Li, S. G., Pan, D. G. and Wang, G. X. (1994) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fume. *Archives of Environmental Health* 49:119-122.
- Lioy, P. L., Waldman, J. M., Greenberg, A., Harkov, R. and Pietarinen, C. (1988) The total human environmental exposure study (THEES) to benzo[a]pyrene: comparsion of the inhalation and food pathwaysArch. *Archives of Environmental Health* 43:304-312.
- Liu, L. and Wang, L. H. (1988) Correlation between lung cancer prevalence and activities of aryl hydrocarbon hydroxylase and glutathione

- s-transferase in human lung tissues. *Biomedical Environmental Science* 1: 277-82.
- McLemore, T. L., Adelberg, S., Liu, M. C., McMahon, N. A., Yu, S. J., Hubbard, W. C., Czerwinski, M., Wood, T. G., Storeng, R. and Lubet, R. A. (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 82:1333-9.
- Mollerup, S., Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H. and Haugen, A. (1999) Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Research* 59:3317-20.
- Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., Watanabe, J. and Kawajiri, K. (1991) Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Research* 51: 5177-80.
- Nebert, D. W. (1989) The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Critical Reviews in Toxicology* 20:153-74.
- Nebert, D. W. and Gelboin, H. V. (1969) The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 134:76-89.
- Nebert, D. W. and Tones, J. E. (1989) Regulation of the mammalian cytochrome P450 (CYP1A1) gene. *International Journal of Biochemistry* 21:234-52.
- Nguyen, T., Rushmore, T. H. and Pickett, C. B. (1994) Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of Biological Chemistry* 269 :13656-13662.
- Okey, A. B., Bendy, G. P., Mason, M. E., Nebert, D. W., Forster-Gibson, C. J., Muncan, J. and Dufresne, M. J. (1980) Temperature-dependent cytosol-to-nucleus translocation of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in continuous cell culture lines. *Journal of Biological Chemistry* 255:11415-11422.
- Okey, A. B., Rjddick, D. S. and Harper, P. A. (1994) Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends in Pharmacological*

Science 15: 226-232.

- Pasquini, R., Sforzolini, G. S., Cavaliere, A., Savino, A., Monarca, S., Puccetti, P., Fatigoni, C. and Antonini, G. (1988) Enzymatic activities of human lung tissue: relationship with smoking habits. *Carcinogenesis* 9:1411-6.
- Pedro-Botet, J., Superv, A., Barranco, C., Sol, R. and Bruguera, M. (1996) Intrahepatic cholestasis without hepatitis induced by amoxicillin/clavulanic acid. *Journal of Clinical Gastroenterology* 23: 137-138.
- Perdew, G. H. (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry* 263:13802-5.
- Perdew, G. H. (1992) Chemical cross-linking of the cyto-solic and nuclear forms of the Ah receptor in hepatoma cell line Iclc7. *Biochemical Biophysical Research Communications* 182:55-62.
- Petruzzelli, S., Camus, A. M., Carrozzi, L., Ghelarducci, L., Rindi, M., Menconi, G., Angeletti, CA. Ahotupa, M., Hietanen, E. and Aitio, A. (1988) Long-lasting effects of tobacco smoking on pulmonary drug-metabolizing enzymes: a case-control study on lung cancer patients. *Cancer Research* 48:4695-700.
- Pollent, R. S., Sattler, C. A. and Poland, A. (1994) The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor calizations in Hepa-Iclc7 cells by immunofluorescence microscopy. *Molecular Pharmacology* 45: 428-438.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M. R., Fukunaga, B. N. and Hankinson, O. (1994) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Molecular & Cellular Biology* 14:6075-86.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A. P., Rutten, A. A. and Baan, R. A. (1993) Comparative ³²P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes. *Carcinogenesis* 14:1945-1950.
- Rothman, N., Oirier, M. C., Baser, M. E., Hansen, J. A., Gentile, C., Bowman, E. D. and Strickland, P. T. (1990) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells during consumption of charcoal-broiled beef. *Carcinogenesis* 11:1241-1246.

- Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H. and Haugen, A. (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Research* 54:5801-3.
- Saarikoski, S. T., Husgafvel-Pursiainen, K., Hirvonen, A., Vainio, H., Gonzalez, F. J. and Anttila, S. (1998) Localization of CYP1A1 mRNA in human lung by in situ hybridization: comparison with immunohistochemical findings. *International Journal of Cancer* 77:33-9.
- Schmidt, J. V. and Bradfield, C. A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 12:55-89.
- Semenza, G. L. (1994) Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematology - Oncology Clinics of North America* 8:863-84.
- Shields, P. G., Xu, G. X., Blot, W. J., Fraumeni, J.F. Jr., Trivers, G. E., Pellizzari, E. D., Qu, Y. H., Gao, Y. T. and Harris, C. C. (1995) Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils. *Journal of the National Cancer Institute* 87:836-41.
- Shimada, T., Yun, C. H., Yamazaki, H., Gautier, J. C., Beaune, P. H. and Guengerich, F. P. (1992) Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Molecular Pharmacology* 41:856-64.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Ishikawa, T. (2000) Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceeding of National Acadenuc Science USA* 97: 779-782.
- Smart, J. and Daly, A. K. (2000) Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. *Pharmacogenetics* 10:11-24.
- Spink, B. C. Fasco, M. J., Gierthy, J. F. and Spink, D. C. (1998) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate upregulates the Ah receptor and differentially alters CYP1B1 and CYP1A1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 70:289-96.
- Swanson, H. I., Tullis, K. and Denison, M. S. (1993) Binding of transformed Ah receptor complex to a dioxin responsive transcriptional enhancer: evidence for two distinct heteromeric DNA-binding forms. *Biochemistry* 32: 12841-12849.

- Takahashi, Y., Nakayama, K., Shimojima, T., Itoh, S. and Kamataki, T. (1996) Expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) in adult rabbits known to be non-responsive to cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) inducers. *European Journal of Biochemistry* 242:512-8.
- Takahashi, Y., Nakayama, K., Shimojima, T., Itoh, S. and Kamataki, T. (1996) Expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) in adult rabbits known to be non-responsive to cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) inducers. *European Journal of Biochemistry* 242:512-8.
- Tay, S. C., Tsai, S. F. and Lee, S. S. (1988) Lung cancer in Taiwan. *National Public Health Association (ROC)* 8:189-201.
- Venier, P., Clonfero, E., Cottica, D., Gava, C., Zordan, M., Pozzoli, L. and Levis, A. G. (1985) Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis* 6:749-752.
- Vickers, P. J., Dufresne, M. J. and Cowan, K. H. (1989) Relation between cytochrome P4501A1 expression and estrogen receptor content of human breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 3:157-164.
- Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:4304-8.
- Wen, C. P., Tsai, S. P. and Yen, D. D. (1994) The health impact of cigarette smoking in Taiwan. *Asia-Pacific Journal of Public Health*. 7:206-13.
- Wheeler, C. W. and Guenther, T. M. (1991) Cytochrome P-450-dependent metabolism of xenobiotics in human lung. *Journal of Biochemical Toxicology* 6:163-9.
- Whitlock, J. P. Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 39:103-25.
- Whitlock, J. P. Jr., Okino, S. T., Dong, L., Ko, H. P., Clarke-Katzenberg, R. Ma, Q. and Li, H. (1996) Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB Journal* 10:809-18.

- Winn, L. M. and Wells, P. G. (1997) Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo[a]pyrene teratogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 22:607-21.
- Wolterbeek, A. P., Roggeband, R., Steenwinkel, M. J. S. T., Bann, R. A. and Rutten, A. A. (1993) Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by ³²P-postlabeling analysis and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis* 14: 463-467.
- World Health Organization. (1982) The World Health Organization histological typing of lung tumors. Second Edition. *American Journal Clinical Pathology* 77:123-136..
- Xu, X., Kelsey, K. T., Wiencke, J. K., Wain, J. C. and Christiani, D. C. (1996) Cytochrome P450 CYP1A1 *Msp*I polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventio* 5:687-692.
- Yang, S. P., Luh, K. T. and Kuo, S. H. (1984) Chronological observation of epidemiological characteristics of lung cancer in Taiwan with etiological consideration-A 30-year consecutive study. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 14:7-19.
- Yoshikawa, M., Arashidani, K., Kawamoto, T. and Kodama, Y. (1994) Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lung tissue: in relation to cigarette smoking and lung cancer. *Environmetal Research* 65:1-11.
- Zang, E. A. and Wynder, E. L. (1996) Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *Journal of the National Cancer Institute* 88:183-92.
- 行政院衛生署 (1998) 中華民國八十四年癌症登記報告. 32-33.
- 陸坤泰、張登斌 (1992) 台灣的肺癌. 台灣醫誌 91:s1-s6.
- 蕭光明 (1992) 台灣地區肺癌之流行病學特徵. 臨床醫學 29:347-352.

第六章、附錄第十五屆生物醫學年會口頭報告摘要

中山醫學院毒理學研究所

廖永生^{*}、蔡崇弘、陳榮達、李輝、林嬪嬪[#]

EXPRESSION OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR AND ARYL HYDROCARBON RECEPTOR NUCLEAR TRANSLOCATOR IN HUMAN LUNG CANCER

Y.-S. Liao^{*}, C.-H. Tsai, J.-T. Chen, H. Lee, and P. Lin[#]. Institute of Toxicology and Department of Pathology, Chung-Shan Medical and Dental College, Taichung, Taiwan, R.O.C.; Department of Pathology, Veterans General Hospital-Taichung, Taiwan, R.O.C.

Lung cancer is the leading and the second-leading cause of cancer deaths among women and men, respectively, in Taiwan. Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) is involved in the bioactivation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In addition, CYP1A1 gene expression is inducible by PAH. According to epidemiological studies, CYP1A1 inducibility is considered to be important with regard to individual susceptibility to lung cancer. It is well-known that CYP1A1 gene induction is mediated through ligand-dependent heterodimerization between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). In the present study, we examined the expression levels of AhR and Arnt in 55 lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma tissues with the immunohistochemical staining method. We found that AhR and Arnt were respectively localized in the cytosol and nuclei of the epithelial cells in lung tumor tissues. The AhR expression level was significantly higher in female than in male lung tumors ($P=0.0005$). Furthermore, the AhR expression level is higher in adenocarcinoma than in squamous cell carcinoma ($P=0.005$). No significant difference in the Arnt expression level was found between different genders and pathological types. However, among lung adenocarcinoma the Arnt expression level was higher in females than in males ($P=0.034$). These findings suggest that AhR and Arnt may play a role in Taiwanese female lung adenocarcinoma.