

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

氮氧化物促進癌化及惡化轉移之作用及機轉(一)抑制化學  
致癌物致細胞凋謝死亡之作用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-039-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：王朝鐘

計畫參與人員：陳璟賢

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 19 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期末成果報告

氮氧化物促進癌化及惡化轉移之作用及機轉(一)抑制化學致癌物致

細胞凋謝死亡之作用

Tumor promoting effect of nitrogen oxides in vitro and in vivo

計畫編號：NSC 94-2320-B-040-039

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

子計畫一主持人：王朝鐘 中山醫學大學生化所 wcj@csmu.edu.tw

計畫參與人員：陳璟賢 中山醫學大學生化所

## 一、摘要

空氣中的氮氧化物(NO<sub>x</sub>)在以前一直被認為僅從燃燒等廢氣產生，是一種體外污染物，最近有許多研究顯示，NO<sub>x</sub>與生物體中蛋白之相互作用扮演著重要的生理角色(1,2)，NO在生體內可與superoxide產生peroxynitrite(3)，在cigarette smoke fraction中也發現peroxynitrite的產生(4)，peroxynitrite已被証實顯示具有神經毒性(5,6)，上皮細胞傷害(7)及脂質過氧化作用(5)等，peroxynitrite也被證實為一種oxidative stress-inducing compound，能造成人類細胞DNA傷害(4,8)，但此是否煙霧或空氣污染物中NO<sub>x</sub>造成肺癌之原因，仍未被證實，過去我們的研究中除了發現NO<sub>x</sub>會攻擊DNA產生8-NO<sub>2</sub>-G(9)外，我們也發現NO<sub>x</sub>能促進MRC-5細胞生長及S phase分佈增加(10)，本研究過去的工作發現氣體性NO<sub>x</sub>對人類肺纖維細胞MRC-5之增生作用，其作用係經由加強Cyclin/CDK活化及Rb磷酸化(11)；從以上結果及許多相關研究，顯示NO<sub>x</sub>可能有tumor promotion的作用，因此我們將進一步探討NO<sub>x</sub>在腫瘤促進作用的角色。由於初步的數據顯示NO<sub>x</sub>有抑制B(a)P(benzo[a]pyrene)致細胞死亡之作用，因此本年的工作將探討NO<sub>x</sub>對化學致癌物

B(a)P誘導之apoptosis之影響及其在antiapoptosis之機轉。

由以上的研究，我們將首先提出NO<sub>x</sub>致癌病變之作用可能在於它的促進腫瘤增生及惡化轉移。

Keywords: Nitrogen Oxides (NO<sub>x</sub>), Tumor promotion, Proliferation, Inflammation, Antiapoptosis

## 二、材料與方法

### 【一】NO<sub>x</sub> gas-saturated medium 製備(9-11)

PBS以N<sub>2</sub> gas去氧30分鐘後，anesthetic NO gas(含N<sub>2</sub>)通入PBS中

30分後，其飽和液以Gries reagent分析NO<sub>x</sub>(NO + NO<sub>2</sub>)濃度，處理細胞之濃度依此濃度稀釋加入細胞培養基中，分析cell free system及在cell system中NO<sub>x</sub>之差異為細胞經外生性NO<sub>x</sub>刺激產生之NO。

### 【二】MTT及apoptosis分析

#### (1) MTT分析

調整MRC-5細胞濃度為2 x 10<sup>5</sup>/ml，以2 ml之細胞沖至microtiter plate，加入B(a)P(1 μM及5 μM)，培養6, 12, 24, 48 hr後，以離心去培養基，加入2 ml新鮮無血清之

培養基與 200  $\mu$ l MTT (5mg/ml)繼續培養 4hr，去除培養液後，加入 1.5 ml isopropanol，均勻分散細胞後離心，取 1ml 上清液在 563 nm 測其吸光，選出B(a)P致apoptosis之條件。

#### (2) Apoptosis-related proteins 分析

癌細胞經B(a)P處理後，其lysate經western blotting分析bcl-2 family(包括Bcl-2, Bax, Bcl-xl及Mcl-1)，CPP 32，cytochrome C等蛋白表現之影響。

#### (3) NOx 抑制B(a)P-mediated apoptosis 及相關蛋白之影響

在上述試驗中加入已配置好之NOx(0~2.5mM)，然後依上述方法分析apoptosis及related proteins。

#### 【三】細胞週期分析

Cell cycle distribution經B(a)P(含或不含NOx)處理0-24 hr，以FACScan分析，以緩衝液洗滌2次，在400 x g離心5 min，去除上清液後加 250  $\mu$ l solution A (trypsin buffer)與細胞混合均勻，在室溫作用10 min，再加入 solution B (trypsin 抑制劑及RNase buffer)，作用10 min後以 solution C (propidium iodide stain solution)在暗處0 $^{\circ}$ C染色10 min後以flow cytometry分析。

#### 【四】抑制apoptosis 機轉分析

PI-3-K/Akt，JNK/NF- $\kappa$ B/IAP及ERK1/2/Bcl-2均有報告顯示與antiapoptosis process有關，我們以B(a)P(含或不含NOx)處理MRC-5細胞，觀察上述蛋白或kinases的影響。

#### (1) Western blotting

取100  $\mu$ g蛋白量之均質液，加入等體積之protein loading buffer，混合均勻，loading至10% SDS-PAGE，電泳完成後，以4 $^{\circ}$ C，100 V轉漬蛋白1 hr，浸入含5% skim milk power之TBS-T buffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0.1%)於室

溫下搖動2小時，加Antibody (PI-3-K, phospho-JNK, phospho-ERK, NF- $\kappa$ B, IAP, Bcl-2)作用3.5小時，再以TBS-T清洗三次後與secondary Ab (0.2  $\mu$ g/ml)反應1小時，以TBS-T清洗，再以ECL呈色系統處理後以X-ray film感光。

#### (2)確認NOx anti-apoptotic process 途徑

加入PD98059，LY294002，SB202190及Wortamanin於B(a)P(含或不含NOx)處理之MRC-5細胞中，依【二】方法，觀察apoptosis的影響。

### 三、結果

#### (一) 氣體性氮氧化物(NOx)對於B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡的相關性

過去研究指出B[a]P在體外與體內實驗都可導致細胞的凋謝死亡(11,12)，為了證實B[a]P也可造成人類肺纖維細胞的凋謝死亡，我們先以不同濃度的B[a]P(1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M)處理MRC-5細胞，圖一A結果發現，以MTT實驗將細胞處理B[a]P 48小時，隨著處理劑量的增加細胞存活率也相對下降，其中發現IC<sub>50</sub>的濃度點為10  $\mu$ M。為了解氣體性氮氧化物(NOx)對於B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡的相關性，MRC-5細胞在處理B[a]P(5, 10  $\mu$ M)下加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液(13)，Fig.1B同樣以MTT實驗結果發現，氣體性氮氧化物(NOx)可抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞的凋謝死亡。

更進一步利用流式細胞儀分析細胞週期發現，MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，24小時sub-G<sub>1</sub> phase有8.4%的細胞凋亡，48小時sub-G<sub>1</sub> phase增加到30.1%的細胞凋亡(Fig.2A)；此外MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下若加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液時，24小時sub-G<sub>1</sub> phase降為4.47%的細胞凋亡，48小時sub-G<sub>1</sub>

phase更降到6.7%的細胞凋亡(Fig.2A)。因此由Fig.2B結果更清楚發現，氣體性氮氧化物(NOx)可抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞的凋謝死亡。

## (二) 氣體性氮氧化物(NOx)對於B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡MAPK訊息路徑的影響

當細胞受到外來刺激時，MAPK家族扮演調控細胞生長、分化及凋謝死亡的重要角色(14)。為了瞭解B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡下，對於MAPK訊息路徑的影響，我們利用西方墨點實驗法分析MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，對於MAPK家族三大成員(ERK1/2、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 與 p38 MAPK)的影響，發現其中只對於JNK1磷酸化(48小時增加2.3倍)有明顯影響(Fig.3A)，進而探究發現，過去有研究指出，MEKK1/JNK1/c-Jun訊息路徑在細胞受外來刺激而凋謝死亡時扮演重要角色(15-17)，因此進而加以分析證實，隨著處理B[a]P(10  $\mu$ M)時間增加下，MEKK1、JNK1與c-Jun都有增加的趨勢(Fig.3A)。為了證實此路徑確實是經由JNK路徑，我們進一步處理JNK抑制劑(SP600125)，結果發現JNK1與c-Jun的表現都受到抑制(Fig.3C)。此外MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下若加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液時，MEKK1/JNK1/c-Jun訊息路徑就受到明顯抑制(Fig.3B)。因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡是經由MEKK1/JNK1/c-Jun訊息路徑，而氣體性氮氧化物(NOx)則扮演抑制此路徑的角色。

## (三) 氣體性氮氧化物(NOx)對於B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡Fas與Fas ligand 訊息路徑的影響

先前研究指出JNK路徑的活化可使細胞內Fas聚集(18)，因此我們先分析Fas與Fas ligand的表現，MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，隨著處理時間增加，Fas與Fas ligand都有增加的趨勢(Fig.4A)。因為Fas與Fas ligand所導致的細胞凋謝路徑有經過caspase-8與t-Bid路徑，因此我們更進一步分析caspase-8與t-Bid，被切割後活化態的caspase-8(Cleaved-Casp-8)與t-Bid都有隨處理時間增長而表現量增加的趨勢(Fig.4A)，因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡是經由Fas-FasL/caspase-8/t-Bid訊息路徑；此外MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下若加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液時，Fas-FasL/caspase-8/t-Bid訊息路徑就受到明顯抑制(Fig.4B)。因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡是經由Fas-FasL/caspase-8/t-Bid訊息路徑，而氣體性氮氧化物(NOx)則扮演抑制此路徑的角色。

## (四) 氣體性氮氧化物(NOx)抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡對於p53及Bcl-2家族訊息路徑的影響

過去研究已證實JNK的下游分子有可能是p53(19)，而p53參與在粒線體細胞凋謝路徑之中(經由活化Bax與使粒線體釋放出cytochrome c)(20,21)。因此我們利用西方墨點法實驗證實，MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，p53磷酸化與Bax都有增加的趨勢，而當加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液時，p53磷酸化與Bax就受到明顯抑制(Fig.5A)。我們更進一步分析Bcl-2家族(Bcl-2與Mcl-1)的表現，MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，Bcl-2與Mcl-1都沒有多大的變化，而當加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液時，

Bcl-2 與 Mcl-1就明顯增加(Fig.5A)。因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡是經由活化p53及Bax訊息路徑，而氣體性氮氧化物(NOx)則一方面抑制此路徑，另一方面則活化 Bcl-2 家族 (Bcl-2 與 Mcl-1)。

#### (五) 氣體性氮氧化物(NOx)抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡對於細胞凋謝下游訊息路徑的影響

分析細胞凋謝粒線體路徑中下游因子蛋白cytochrome c、caspase-9、caspase-3(22)表現，利用西方墨點法實驗證實，MRC-5細胞在處理B[a]P( 10  $\mu$ M )下，粒線體外(細胞質中)的 cytochrome c 隨著處理時間增加，表現有增加的趨勢，相對粒線體內的 cytochrome c 表現，隨著處理時間增加，表現有減少的趨勢(Fig.6A)；因此我們更進一步分析caspase-9與caspase-3，被切割後活化態的 caspase-9(Cleaved-Casp-9)與caspase-3(Cleaved-Casp-3)都有隨處理時間增長而表現量增加的趨勢(Fig.6A)；MRC-5細胞在處理B[a]P( 10  $\mu$ M )下若加入1 $\mu$ M濃度的飽和氣體氮氧化物溶液時，粒線體外(細胞質中)的 cytochrome c 隨著處理時間增加，表現有下降的趨勢，相對粒線體內(膜內)的 cytochrome c 表現，隨著處理時間增加，表現有增加的趨勢(Fig.6A)。而caspase-9與caspase-3，被切割後活化態的 caspase-9(Cleaved-Casp-9)與caspase-3(Cleaved-Casp-3)都有隨處理時間增長而表現量下降的趨勢(Fig.6A)。因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡下游因子 cytochrome c、caspase-9、caspase-3 表現，而氣體性氮氧化物(NOx)則扮演抑制此路徑的角色。

#### 四、討論

在本研究，我們證實了氣體性氮氧化物(NOx)抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡，正如Fig.7所示，氣體性氮氧化物(NOx)抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡分子機轉是經由一方面抑制 JNK1/FasL 與 JNK1/p53 訊息路徑，另一方面活化抗細胞凋謝因子Bcl-2 與 Mcl-1 的表現。

B[a]P目前已知是一種致癌物質，它對於腫瘤成長有正相關性(13)，雖然目前已有相當多研究針對B[a]P誘導各種細胞凋謝，但少有研究針對B[a]P誘導細胞凋謝路徑多加探討，尤其是MAPK路徑。在1998年有學者研究指出，B[a]P誘導肝臟細胞Hepal1c7凋謝是經由JNK路徑(11)。而本研究證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝是經由JNK1路徑，本研究結果也再次證實JNK在細胞中的雙重角色(刺激細胞增生分化或者是刺激細胞凋謝)，而JNK路徑已被證實當細胞受到不同刺激因子、不同型態細胞因素及細胞生長環境因素等影響會啟動細胞增生分化或者是刺激細胞凋謝反應(29)。

雖然NO在以前研究上多以傷害細胞角色為主，但近年來逐漸發現NO的抗細胞凋謝角色(23)，包括在保護肝細胞(24)及其他細胞(25)的凋謝死亡，以及各種外來刺激下證實NO的抗細胞凋謝角色(26-28)。所以本篇研究提出了氣體性氮氧化物(NOx)抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡，而這過程可能經由直接或者是間接的作用所導致：直接作用方面，NOx可能經由抑制caspases活性而達到抑制細胞凋謝死亡的結果(Fig.6)；間接作用方面，NOx可能經由調控抗凋謝死亡家族 Bcl-2 家族成員(Bcl-2與Mcl-1)活性，而達到抑制細胞凋謝死亡的結果(Fig.5)。同樣也發現，NOx可抑制B[a]P所誘導粒線體中

cytochrome c 釋放到細胞質(Fig.6)。先前研究指出JNK路徑的活化可使細胞內Fas聚集(18)，本研究也證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋亡是經由JNK1路徑，且MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，隨著處理時間增加，Fas與Fas ligand都有增加的趨勢(Fig.4)，且因為Fas與Fas ligand所導致的細胞凋亡路徑有經過caspase-8與t-Bid路徑，因此我們更進一步分析caspase-8與t-Bid，被切割後活化態的caspase-8(Cleaved-Casp-8)與t-Bid都有隨處理時間增長而表現量增加的趨勢(Fig.4)，因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡是經由Fas-FasL/caspase-8/t-Bid訊息路徑經由活化下游因子FasL路徑所啟動細胞凋亡(Fig.4)。此外，因過去研究已證實JNK的下游分子有可能是p53(19)，而p53參與在粒線體細胞凋亡路徑之中(經由活化Bax與使粒線體釋放出cytochrome c)(20,21)。因此我們發現MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，p53磷酸化與Bax都有增加的趨勢，而當加入1 $\mu$ M NO<sub>x</sub>時，p53磷酸化與Bax就受到明顯抑制(Fig.5)。我們更進一步分析Bcl-2家族(Bcl-2與Mcl-1)的表現，MRC-5細胞在處理B[a]P(10  $\mu$ M)下，Bcl-2與Mcl-1都沒有多大的變化，而當加入1 $\mu$ M濃度的NO<sub>x</sub>時，Bcl-2與Mcl-1就明顯增加(Fig.5)。因此證實B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡是經由活化p53及Bax訊息路徑。最後釐清NO<sub>x</sub>參與B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋亡之分子機轉，一方面是經由抑制下游細胞凋亡訊息路徑，另一方面活化抗細胞凋亡因子Bcl-2與Mcl-1的表現。

總之，氣體性氮氧化物(NO<sub>x</sub>)抑制B[a]P誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡路徑經由本研究首次提出詳細分子機轉，這結

果不但提供另一個NO角色探討的依據，而且對於二種空氣污染物質B[a]P與NO<sub>x</sub>之間交互作用，對於未來研究環境毒物方面提供一個新的思考方向。

## 五、參考文獻

1. Stamler, J.S., Simon, D.L., and Loscalzo, J. (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 444-448.(1992)
2. Stamler, J.S., Singel, D.J. and Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 1898-1902.
3. Pryor, W.A., and Squadrito, G.L. (1995) The Chemistry of peroxynitrite. A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.*, 268, L699-L722.
4. Muller, T., Haussmann, H.J., and Schepers, G. (1997) Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis*, 18, 295-301.
5. Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M., and Negata, C. (1995) Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, 314, 462-464.
6. Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Sizing, Z.L., Chen, H.S.V., Sucher, N.J., and Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitrite oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364, 626-632.

7. Bechman, J.A., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxy radical production: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Aca. Sci.*, 87, 1620-1624.
8. Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M., and Negata, C. (1995) Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, 314, 462-464.
9. Hsieh, Y.S., Wang, H.C., Tseng, T.H., Chang, W.C., and Wang, C.J. (2001) Gaseous nitric oxide-induced 8-nitroguanine formation in human lung fibroblast cells and cell free DNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 172, 210-216.
10. Chou, F.P., Tseng, T.H., Chen, J.H., Wang, H.C., and Wang, C.J. (2002) Induced proliferation of human MRC-5 cells by gaseous nitrogen oxides via direct and indirect activation of MEKK1, JNK and P38 signals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 181, 203-208.
11. Lei, W., Yu, R., Mandelkar, S. and Kong, A.N. (1998) Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 58, 2102-2106.
12. Gosset, P., Garcon, G., Casset, A., Fleurisse, L., Hannotiaux, M. H., Creusy, C. and Shirali, P. (2003) Benzo(a)pyrene-coated onto Fe(2)O(3) particles-induced apoptotic events in the lungs of Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* 143, 223-232.
13. Chen, J. H., Tseng, T. H., Ho, Y. C., Lin, H. H., Lin, W. L., Wang, C. J. (2003) Gaseous nitrogen oxides stimulate cell cycle progression by retinoblastoma phosphorylation via activation of cyclins/Cdks. *Toxicol Sci.* 76, 83-90.
14. Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 14843-14846.
15. Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J. and Tan, T. H. (1996) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* 271, 31929-31936.
16. Kwan, R., Burnside, J., Kurosaki, T., Cheng, G. (2001) MEKK1 is essential for DT40 cell apoptosis in response to microtubule disruption. *Mol. Cell Biol.* 21, 7183-7190.
17. Soh, J. W., Mao, Y., Liu, L., Thompson, W. J., Pamukcu, R., Weinstein, I. B. (2001) Protein kinase G activates the JNK1 pathway via phosphorylation of MEKK1. *J. Biol. Chem.* 276, 16406-16410.
18. Chen, Y., Lai, M. Z. (2001) c-Jun NH2-terminal kinase activation leads to a FADD-dependent but Fas ligand-independent cell death in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 276, 8350-8357.
19. Milne, D. M., Campbell, L. E., Campbell, D. G., and Meek, D. W. (1995) p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. *J. Biol. Chem.* 270, 5511-5518
20. Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell.* 11, 577-590
21. Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., and Green, D. R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and

apoptosis. *Science*. 303, 1010-1014.

22. Gibson, E. M., Henson, E. S., Villanueva, J., Gibson, S. B. (2002) MEK kinase 1 induces mitochondrial permeability transition leading to apoptosis independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 277, 10573-10580.

23. Kim, Y. M., Chung, H. T., Simmons, R. L., Billiar, T. R. (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.* 275, 10954-61.

24. Kim Y. M., de Vera, M. E., Watkins, S. C., Billiar, T. R. (1997) Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 272, 1402-1411.

25. Kim, Y. M., Talanian, R. V., and Billiar, T. R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 272, 31138-31148.

26. Kwon, Y. G., Min, J. K., Kim, K. M., Lee, D. J., Billiar, T. R., and Kim, Y. M. (2000) Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* 276, 10627-10633.

27. Kim, Y. M., Bergonia, H. and Lancaster, J. R. (1995) Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 374, 228-232.

28. Kim, Y. M., Chung, H. T., Kim, S. S., Han, J. A., Yoo, Y. M., Kim, K. M., Lee, G. H., Yun, H. Y., Green, A., Li, J., Simmons, R. L. and Billiar, T. R. (1999) Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J. Neurosci.* 19, 6740-6747.

29. Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K. and Tsuruo, T. (1999) ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene.* 18, 173-180.

## 六、結果

### 圖一、氣體性氮氧化物(NOx)對於 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡的相關性

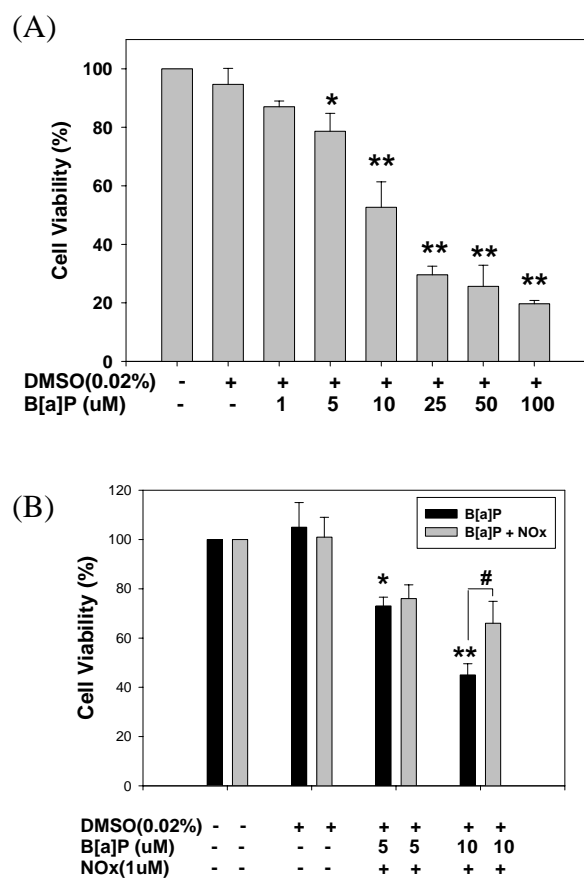
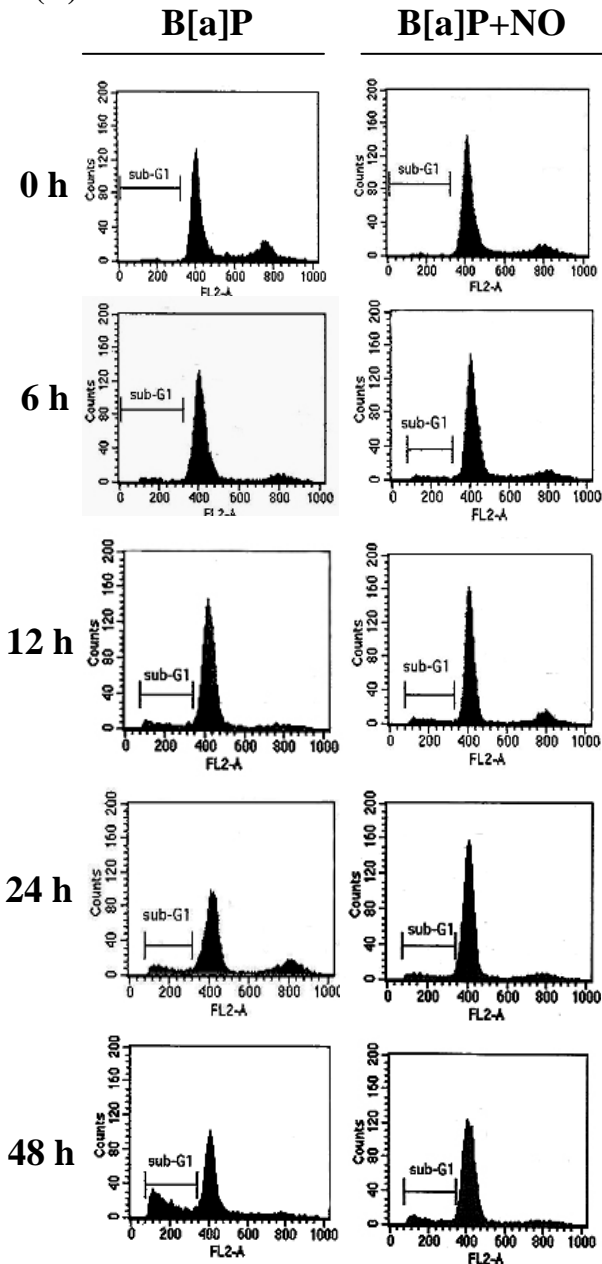


Fig. 1 Effect of NO gas on the cell viability of MRC-5 cells in B[a]P-induced MRC-5 cell apoptosis. (A) Cultured cells were treated with B[a]P (1, 5, 10, 25, 50, 100 IM B[a]P for final concentrations) for the indicated times. (B) Cultured cells were treated with B[a]P (5, 10 IM B[a]P for final concentration) in NO gas-saturated solution (1 IM NOx solution for final concentration) for the indicated times. Cell viability was analyzed by MTT assay. The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent studies. \*P<0.05; \*\*P<0.005, compared with 0 h control cells that treated with B[a]P. #P<0.05, cells that treated with NO gas-saturated solution and B[a]P compared to those treated with B[a]P only in each indicated time point.



圖二、氣體性氮氧化物(NOx)對於 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡的相關性 (A)



(B)

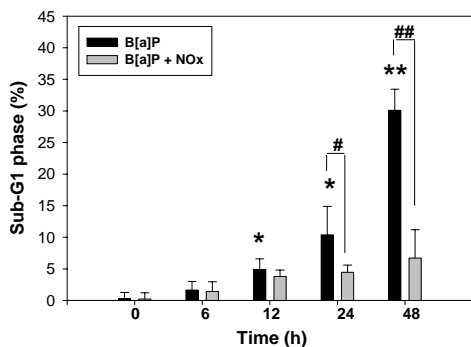


Fig. 2 Effect of NO gas on the cell cycle distribution in B[a]P-induced MRC-5 cell apoptosis. Cultured cells were treated with B[a]P (10  $\mu$  M B[a]P for final concentration) in NO gassaturated solution (1  $\mu$  M NOx solution for final concentration) for the indicated times. (A) Apoptosis was analyzed by flow cytometry, and the percentage of apoptotic cells distributed in sub-G1 phase was compared to the untreated controls. (B) The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent studies. \*P<0.05; \*\*P<0.005, compared with control cells that without B[a]P treatment. #P<0.05; ##P<0.005, cells that treated with NO gas-saturated solution and B[a]P compared to those treated with B[a]P only in each indicated time point.

圖三、氣體性氮氧化物(NOx)對於 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡 MAPK 訊息路徑的影響

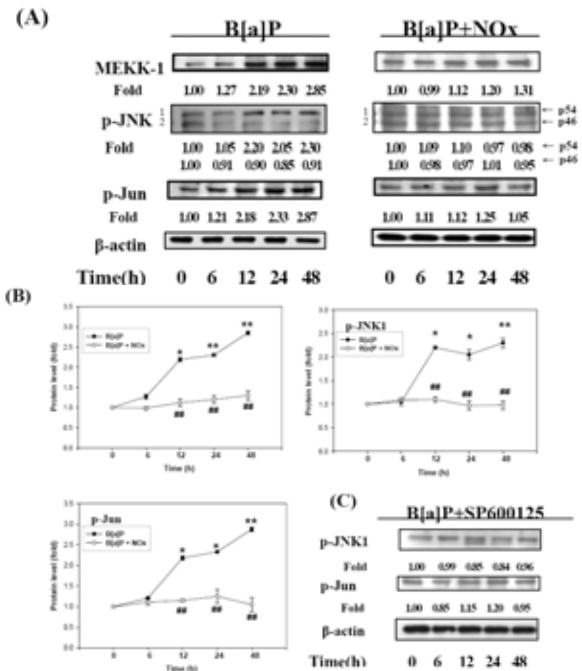


Fig. 3 Induction of MAPK cascades by B[a]P and the effect of NO gas-saturated solution on the B[a]P-induced MAPK cascades. MRC-5 cells were treated with B[a]P (10  $\mu$  MB[a]P for final concentration) or B[a]P added in NO gas-saturated solution (1  $\mu$  M NOx solution for final concentration) for the times indicated. Cell lysates were prepared for Western blotting analysis. a The protein levels (fold) of MEKK1, phosphorylated JNK1/2 (p-JNK1/2) and phosphorylated Jun (p-Jun) were analyzed by immunoblotting. Actin: loading control. b The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent studies. C MRC-5 cells were treated with B[a]P and JNK inhibitors, SP600125 (20 IM for final concentration) for the times indicated. \*P<0.05; \*\*P<0.005, compared with control cells that without B[a]P treatment. #P<0.05; ##P<0.005, cells that treated with NO gas-saturated solution and B[a]P compared to those treated with B[a]P only in each indicated time point.

圖四、氣體性氮氧化物(NOx)對於 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡 Fas 與 Fas ligand 訊息路徑的影響

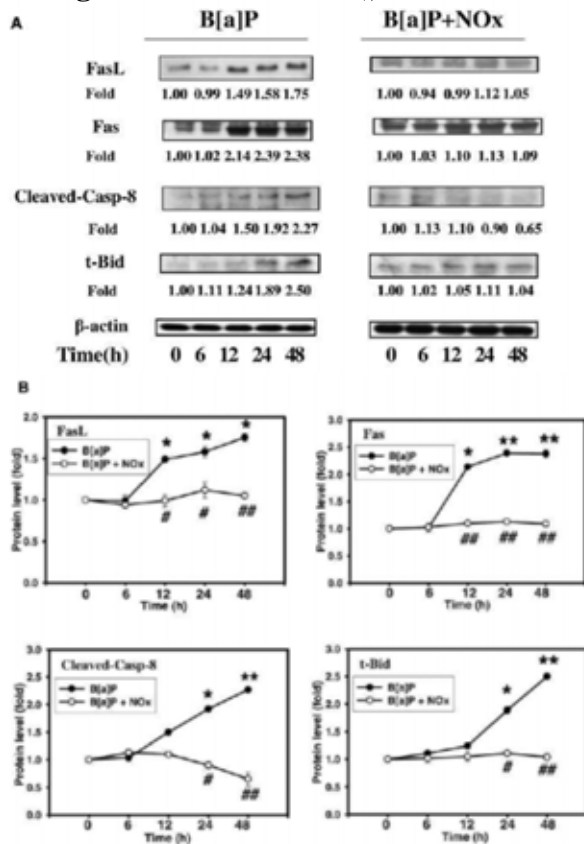


Fig. 4 Effect of NO gas on the expression of Fas-Fas ligand (FasL) pathway in B[a]P-induced MRC-5 cell apoptosis. MRC-5 cells were treated with B[a]P or B[a]P added in NO gas-saturated solution for the times indicated. Cell lysates were prepared for Western blotting analysis. (A) The protein levels of FasL, Fas, cleaved caspase-8 (Cleaved-Casp-8), and the truncated form of Bid (t-Bid) were analyzed by immunoblotting. Actin: loading control. (B) The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent studies. \*P<0.05; \*\*P<0.005, compared with control cells that without B[a]P treatment. #P<0.05; ###P<0.005, cells that treated with NO gas-saturated solution and B[a]P compared to those treated with B[a]P only in each indicated time point.

圖五、氣體性氮氧化物(NOx)抑制 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡對於 p53 及 Bcl-2 家族訊息路徑的影響

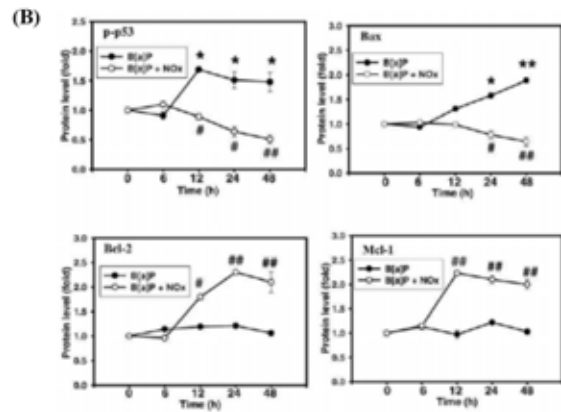
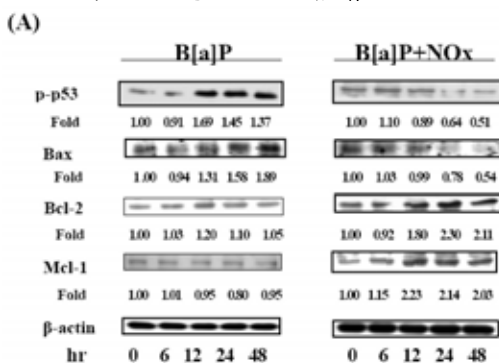


Fig. 5 Effect of NO gas on the expression of p53 and Bcl-2 family proteins in B[a]P-induced MRC-5 cell apoptosis. MRC-5 cells were treated with B[a]P or B[a]P added in NO gas-saturated solution for the times indicated. Cell lysates were prepared for Western blotting analysis. (A) The protein level of p53 phosphorylation (pp53), Bax, Bcl-2 and Mcl-1 were analyzed by immunoblotting. Actin: loading control. (B) The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent studies. \*P<0.05; \*\*P<0.005, compared with control cells that without B[a]P treatment. #P<0.05; ###P<0.005, cells that treated with NO gas-saturated solution and B[a]P compared to those treated with B[a]P only in each indicated

圖六、氣體性氮氧化物(NOx)抑制 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡對於細胞凋亡下游訊息路徑的影響

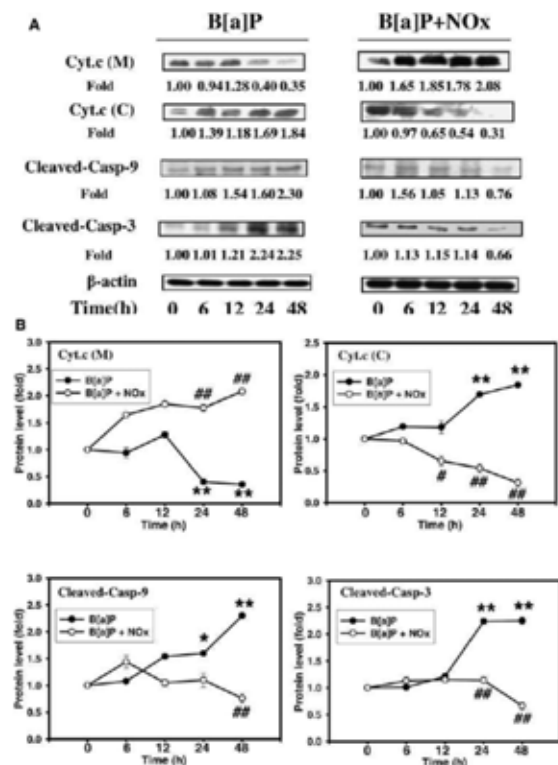


Fig. 6 Effect of NO gas on the expression of downstream apoptotic proteins in B[a]P-induced MRC-5 cell apoptosis. MRC-5 cells were treated with B[a]P or B[a]P added in NO gas-saturated solution for the times indicated. Cell lysates were prepared for Western blotting analysis. (A) The protein levels of cytochrome c (in the cytosol (C) and in the mitochondria (M)), cleaved caspase-9 (Cleaved-Casp-9) and cleaved caspase-3 (Cleaved-Casp-3) were analyzed by immunoblotting. Actin: loading control. (B) The quantitative data were presented as means  $\pm$  SD of three independent studies. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ , compared with control cells that without B[a]P treatment. # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.005$ , cells that treated with NO gas-saturated solution and B[a]P compared to those treated with B[a]P only in each indicated time.

圖七、氣體性氮氧化物(NOx)抑制 B[a]P 誘導人類肺纖維細胞凋謝死亡之機轉

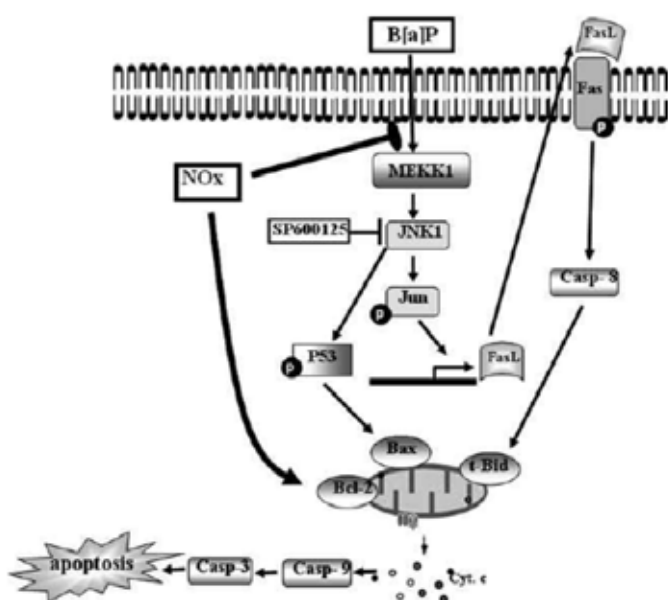


Fig. 7 Possible mechanisms of the inhibitory effect of gaseous nitrogen oxide on the B[a]P-induced human lung fibroblast cells apoptosis