

R
068.8
7542
88

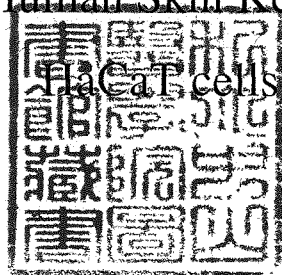
中山醫學院毒理學研究所碩士論文

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

指導教授：林嬪嬪 博士 (P. Lin, Ph. D.)

人類皮膚細胞株(BCC、HaCaT)對環境致癌物
benzo[a]pyrene 敏感性差異機轉之研究

The Mechanisms of Differential Susceptibility to
Benzo[a]pyrene in Human Skin Keratinocytes, BCC and



研究生：陳世殷 (Shin-Yin Chen) 撰

參考書恕不外借
中華民國八十八年六月
(June, 1999)

中山醫學院圖書館



C055234

授權書
(博碩士論文)

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

論文名稱: 人類皮膚細胞株(BCC、HaCaT)對環境致癌物 benzo[a]pyrene
敏感性差異機轉之研究

同意 不同意

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

同意 不同意

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

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

指導教授姓名: 林嬪嬪

研究生簽名: 李世毅 學號: R86506
(親筆正楷)

日期: 民國 88 年 6 月 日

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在兩種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年以後全文資料微片目錄資料庫以上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫以上載於教育部國家圖書館網站www.ncl.edu.tw。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書，著作人日後不可以主張終止本授權書，您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。
3. 全國博碩士論文全文資料整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存（微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年），也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)27377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 陳世殷 聯絡電話: (02)22657001 0935332863

地址: 台北縣土城市明德路一段 195 巷 7 弄 7 號

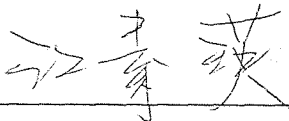
人類皮膚細胞株(BCC、HaCaT)對環境致癌物 benzo[a]pyrene
敏感性差異機轉之研究

The Mechanisms of Differential Susceptibility to Benzo[a]pyrene
in Human Skin Keratinocytes, BCC and HaCaT cells

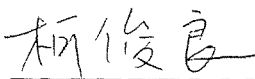
本論文為中山醫學院授與理學碩士學位必備條件之一，經中山醫學院
毒理學研究所碩士論文考試委員會審查及口試通過。

口試委員

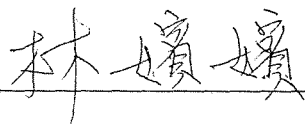
中國醫藥學院中國醫學研究所助理教授 江素瑛 博士



中山醫學院毒理學研究所副教授 柯俊良 博士



中山醫學院毒理學研究所副教授
(本論文指導教授) 林嬪嬪 博士



中華民國八十八年六月

學生陳世殷論文題目為人類皮膚細胞株(BCC、HaCaT)對環境致癌物 benzo[a]pyrene 敏感性差異機轉之研究，其論文已經中山醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並經由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：林嬪嬪 博士

簽名：林嬪嬪

中國民國八十八年七月二十三日

謝 誌

鳳凰花開時，乘風破浪的帆船再次進港，兩年碩士班訓練的過程在此即將告一段落，但並非就此高掛舵槳，而是等待另一次揚帆出發，一路走來，得之於人者太多，出之於己者太少，但心中卻是充滿無限的感激。

首先感謝恩師 林嬪嬪 博士，兩年來細心的指導及無怨的教誨，無論是待人處世或學術研究皆讓我有十足的長進，於論文撰寫期間，更是不辭辛勞對本論文的架構與內容悉心斧正，使本論文得以完成，在此致上最深摯的謝意。

文稿初成，複蒙中國醫藥學院中國醫學研究所 江素瑛 博士及本校毒理學研究所 柯俊良 博士撥冗審閱，詳加斧正，並提供寶貴的意見，使本論文更密實周延，謹誌由衷致謝。

研究期間承蒙 李輝 所長的鼓勵、邊樹萱 老師的關愛及王憶卿 老師的照顧，讓我身處逆境時，仍時時感到溫暖。吳文俊 博士您雖然不是我的指導教授，但在學術及生活上的指導，更是讓我獲益良多，真是我的良師亦友，在這裡一併跟您說聲謝謝。

感謝 秀仁學姊，妳是我們實驗室的中流砥柱，有妳的照顧，讓我在實驗上及生活上皆沒有後顧之憂，在這裡我只能說聲有妳在的感覺真好。剛瑋學長，謝謝你在實驗上的訓練，以及生活上帶給我的歡愉，為我在碩士班的生活增添了美麗的色彩。另外，我同窗六年的好兄弟 國文，感謝你一路走來相互扶持，所有的甘苦將化成美麗的回憶，永遠存在你我的心中，我們一時的緣分，一生的朋友，祝你從此飛黃騰達。

我認真、可愛又帥氣的學弟 永生，天真、活潑又善良的學妹 育秀，以及兩位率真的榮譽家族成員 古小玉—怡君、淑女—佩蓉，謝謝你們在實驗上及生活上的協助，在你們的陪伴下，讓我每天都能笑口常開，保持愉快的心情，感謝你們所為我做的一切，3Q。(三位率真的學妹，再差一步就能達到淑女標準了，加油!)

此外還要感謝 廖娟妙老師與大美女同學 浴伶，提供儀器設備讓我的實驗能順利進行。 中興大學食品科學研究所 康自強學長，清華大學生科所 程淑慧學姊，中興大學獸醫學研究所 張元衍，培湖、佳芳、培亮、滢太、國豪、又文、嘉一、智尹、文虎同窗好友，昭伶、蘭蕙、娟如、怡杰、韶瓏、伶雅、健群、哲維、明昌、冠穎、惠珠等可愛的學弟妹，謝謝你們曾給予我的幫忙與鼓勵，以及在我身後默默幫助我，陪我一路走來的夥伴們，在此一並致上最深的謝意。

最後，僅將這小小的成果獻給我最親愛的父母、家人及美瓔，感謝你們在身後給我無限的支持，沒有你們，就沒有今天的我，在短短的人生旅途中，你們豐富了我人生的每一頁，而再多的言語也不足以表達我心中對你們的感激，容我說聲— 我愛你們。

陳 世 殷 謹誌於
中山醫學院毒理學研究所
中華民國八十八年七月二十四日

ABBREVIATIONS

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	TCDD
Ah receptor nuclear translocator	Arnt
Aldehyde dehydrogenase	ALDH
Ammonium persulfate	AP
Aryl hydrocarbon hydrolase	AHH
Aryl hydrocarbon receptor	AhR
Basal medium eagle	BME
Benzo[<i>a</i>]anthracene	B[<i>a</i>]A
Benzo[<i>a</i>]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide	BPDE
Benzo[<i>a</i>]pyrene	B[<i>a</i>]P
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	B[<i>b</i>]FA
Benzo[<i>e</i>]pyrene	B[<i>e</i>]P
Benzo[<i>g,h,i</i>]pyrene	B[<i>g,h,i</i>]P
Bovine serum albumin	BSA
Cytochrome P450 IA1	CYP1A1
Cytochrome P450 IB1	CYP1B1
Didecyl sulfate sodium	SDS
Diethylpyrocarbonate	DEPC
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dithiothreitol	DTT
Ethidium bromide	EtBr
Ethylene diaminetetraacetic acid	EDTA
Fetal bovine serum	FBS
Fluoranthene	FA
Genistein	Gen.
Glutathione-s-transferases	GST

Herbimycin A	Her.A
Keratin 1	K1
Keratin 10	K10
NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1	NQO1
Non-essential amino acid	NEAA
Normal melting agarose	NMA
Phenanthrene	Phen
Phenylmethylsulfonylfluride	PMSF
Polycyclic aromatic hydrocarbon	PAH
Pyrene	Pyr
Sprague Dawley	SD
Tetramethyle thylenediamine	TEMED
tris[hydroxymethyl]-aminomethane	Tris
Tris-hydrochloride	Tris-HCl
Trypsin and EDTA	T/E
Xenobiotic responsive element	XRE
β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide- Phosphate	β -NADPH

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	4
第一章 前言	6
第二章 文獻總論	
第一節 環境污染物~多環芳香烴類化合物的來源與分佈	8
第二節 多環芳香烴類之物化性與生成機制	9
第三節 多環芳香烴類化合物之毒性	10
第四節 多環芳香烴類化合物之代謝路徑	11
第五節 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)與 Ah receptor nuclear translocator (Arnt)	13
第三章 材料與方法	
第一節 材料	
一、材料與藥品	24
二、細胞來源	24
第二節 方法	
一、細胞培養	25
二、細胞分盤	25
三、冷凍細胞	26
四、解凍細胞	26
五、測定存活細胞數	27
六、細胞影像攝影	27
七、細胞增生實驗	28
八、RNA 純化	28

九、製備互補 DNA (cDNA)	30
十、半定量 RT-PCR	30
十一、Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 酵素測定	34
十二、Papanicolaou's 染色	35
十三、製備細胞均質液	35
十四、細胞核、質分離之蛋白萃取	36
十五、蛋白定量分析	37
十六、西方墨點法	38
十七、Gel retardation assay	39
十八、統計方法	40
第四章 實驗結果與討論	
第一節 BCC 和 HaCaT 細胞株，細胞型態及分化程度之比較	41
第二節 B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株生長之影響	48
第三節 B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中誘導 CYP1A1 酵素 活性之程度	50
第四節 B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株之 CYP1A1、CYP1B1、 NQO1、AhR 與 Arnt 基因表現的影響	52
第五節 比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 蛋白表現 之程度	60
第六節 B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中活化 AhR 的能力	63
第七節 探討 BCC 細胞株中是否某種 kinase 蛋白過度活化， 以致影響 B[a]P 活化 AhR/Arnt 之作用	66
第五章、參考文獻	74

中文摘要

已知多環芳香烴類化合物【包括 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) 與 benzo[a]pyrene(B[a]P) 等】可經由活化 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 與 Aryl-hydrocarbon-receptor nuclear translocator (Arnt), 誘導許多代謝酵素基因表現, 包括 cytochrome P450 IA1(CYP1A1)、cytochrome P450 IB1(CYP1B1)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutathione-S-transferases (GST)及 aldehyde dehydrogenase (ALDH)基因。近年來也有研究報導指出, AhR 與 Arnt mRNA 表現量會隨著皮膚表皮層分化而增加, 即表示 AhR 和 Arnt 與細胞分化有關。將 TCDD 塗抹於小鼠皮膚乳頭狀瘤及鱗狀上皮細胞癌的病變組織及周邊正常組織 24 小時後, 周邊正常組織的 CYP1A1 酵素活性增高, 但病變組織的 CYP1A1 酵素活性並未增加。因此皮膚組織癌化會抑制 TCDD 誘導基因表現的作用, 但是其機轉仍不清楚。本研究比較 B[a]P 在人類皮膚基底癌細胞株(human basal cell carcinoma, BCC)與人類皮膚表皮細胞株(human immortalized non-tumorigenic keratinocytes, HaCaT)中誘導 CYP1A1 基因表現之差異性, 並進一步探討其機轉。首先以細胞型態、Papanicolaou's 染色法及西方墨點法(檢測分化指標 K1-K10 和 involucrin)等方法, 比較這兩株細胞型態及分化程度。結果顯示, HaCaT 細胞株隨著培養

時間越久分化程度越高，而 BCC 細胞株分化程度比 HaCaT 細胞株低，因此 BCC 細胞株為癌化的皮膚細胞，已喪失細胞分化之能力，而 HaCaT 細胞株代表正常皮膚細胞，具有正常分化能力。接著觀察以 1 與 10 μ M B[a]P 處理 24 小時後對細胞生長之影響，結果在移除 B[a]P 後繼續培養 96 小時，只有 HaCaT 細胞株的生長情形受到抑制，存活率分別為對照組的 29.1 % 與 23.7 %，而 B[a]P 對 BCC 細胞株生長並無明顯影響。已知 B[a]P 會誘導 CYP1A1 基因表現，而 CYP1A1 參與 B[a]P 的代謝活化，將 B[a]P 轉變為致癌性的代謝物，對細胞產生毒性。當我們分別以 Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 法測定 CYP1A1 酵素活性及 RT-PCR 檢測 CYP1A1 基因表現時發現，B[a]P 誘導 HaCaT 細胞株之 CYP1A1 酵素活性及基因表現分別為對照組的 40 倍及 8 倍；而 B[a]P 誘導 BCC 細胞株之 CYP1A1 酵素活性及基因表現的能力則較低 (約 2 倍)。已知多環芳香烴類化合物經由活化 AhR 與 Arnt，與 CYP1A1 基因的 enhancer 內之 dioxin responsive element (DRE) 鍵結，進而調控 CYP1A1 基因的表現，另外又有研究指出，在皮膚組織及 HaCaT 細胞中，AhR 與 Arnt 的表現程度與細胞分化程度有關，因此我們利用半定量 RT-PCR 及西方墨點法檢測 AhR 與 Arnt 的表現，發現這兩株細胞中 AhR 與 Arnt 的基因及蛋白皆有表現，而且其表現的程度不受 B[a]P 的影響，因此這

兩株細胞的 CYP1A1 基因被誘導之差異性可能與 AhR、Arnt 蛋白表現程度無關。另外，經過細胞培養 10 天後(細胞分化程度增高)，HaCaT 細胞株的細胞質中，AhR 與 Arnt 蛋白表現會隨著細胞分化程度增加而增加，但在 BCC 細胞株中並沒有明顯的增加。我們進一步以 gel retardation 方法分析 AhR 與 Arnt 被 B[a]P 活化的程度，結果發現 HaCaT 細胞株處理 B[a]P 2 小時後，會增加 AhR/Arnt 複合物與 DRE 鍵結的能力，但 BCC 細胞處理 B[a]P 2 小時後，並不會增加 AhR/Arnt 複合物與 DRE 鍵結的能力。接著，將 BCC 細胞預先處理 50 μ M 及 100 μ M genistein 或 1 ng/ml 及 5 ng/ml herbimycin A (tyrosine kinase inhibitors) 15 分鐘後，再處理 10 μ M B[a]P，則會增加 CYP1A1 基因的表現(分別為對照組的 2.71 倍及 3.65 倍)，且呈劑量反應關係。由以上實驗可知，BCC 細胞株對 B[a]P 的抗藥性，可能由於 BCC 細胞株中存在某種 kinase 蛋白，影響 B[a]P 活化 AhR 與 Arnt 及誘導 CYP1A1 基因表現之能力，而且 AhR 與 Arnt 的功能喪失可能與細胞癌化或失去分化能力有關。

英文摘要

It has been shown that polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) induce gene expression of cytochrome P450IA1(CYP1A1), cytochrome P450 IB1(CYP1B1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione-s-transferases (GST) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) through activation of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). AhR and Arnt are also reported to relate to differentiation and carcinogenesis. The mRNA level of AhR and Arnt were increased during keratinocyte differentiation. Previous studies demonstrated that CYP1A1 induction was suppressed in chemically-induced mouse skin papillomas and squamous cell carcinomas. In the present study, we observed differential CYP1A1 inducibility between a spontaneously immortalized human keratinocyte HaCat cell line and a human skin basal cell carcinoma (BCC) cell line. HaCaT cells persist differentiation ability and express both early and late differentiation markers (K1, K10, and involucrin). However, BCC cells only express early differentiation markers (K1 and K10) and fail to differentiate. In HaCaT cells, treatment with 1 μ M or 10 μ M B[a]P for 24 hr reduced viable cell numbers 3 days later. But B[a]P failed to decrease viable cell number in BCC cells. It is known that B[a]P does not only induce CYP1A1 gene expression but are also metabolically activated by CYP1A1. Therefore, we further examined CYP1A1 gene expression and enzyme activity in B[a]P-treated HaCaT and BCC cells. Both CYP1A1 gene expression and enzyme activity are only induced by B[a]P in HaCaT

cells, but not in BCC cells. The levels of AhR and Arnt in HaCaT cells were increased during differentiation. When we utilized a gel retardation assay to detect AhR activation, B[a]P induced a Banding with the [³²p]-dioxin responsive element in nuclear extract from HaCaT cells, but not in nuclear extract from BCC cells. Pretreatment with tyrosine kinase inhibitor-genistein or herbimycin A 15 minutes increased B[a]P-induced CYP1A1 gene expression to 2.71 or 3.65 fold of control. Our results suggest that certain tyrosine kinases are overexpression in BCC cells, which effected AhR/Arnt-DNA binding ability and downregulated CYP1A1 gene expression.

第一章、前言

多環芳香烴類化合物 (PAHs) 廣泛存在於環境中，為一種很強的致癌物，會誘導皮膚細胞癌化。PAHs 可經由活化 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 與 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)，誘導許多代謝酵素基因表現，包括 cytochrome P450 IA1 (CYP1A1)、cytochrome P450 IB1 (CYP1B1)、NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutathione-S-transferases (GST) 及 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 等基因，增加其酵素活性。這些酵素活性的改變會直接影響細胞代謝活化或解毒的能力。近年來也有文獻指出，AhR 和 Arnt 與細胞分化及癌化有關。當利用原位雜交法檢測 AhR 與 Arnt mRNA 在人類表皮層中表現的位置時發現，隨著表皮層中角質細胞分化程度愈高，AhR 與 Arnt mRNA 表現量愈多；而在完全不分化的基底表皮細胞中，無法偵測到 AhR 與 Arnt 的 mRNA。另外在小鼠皮膚癌組織中，CYP1A1 基因的表現被多環芳香烴類化合物 (PAHs) 誘導的程度比其周邊正常組織為低，表示皮膚組織在癌化後會抑制 PAHs 誘導基因表現的作用，但是其機轉仍不清楚。因此 AhR 與 Arnt 的功能或表現可能會因細胞癌化而改變，進而影響 PAHs 誘導基因表現的作用。我們利用兩株人類皮膚角質細胞，一為人類皮膚基底層癌細胞

株(human basal cell carcinoma keratinocytes , BCC) ; 另一個為人類皮膚表皮細胞株 (human spontaneously immortalized non-tumorigenic keratinocytes , HaCaT) , 比較癌化的皮膚細胞 (BCC) 與非癌化正常皮膚細胞 (HaCaT) 在處理 benzo[a]pyrene (一種誘導皮膚癌化的多環芳香烴類化合物) 後 , 這兩株細胞 CYP1A1 酵素活性被 benzo[a]pyrene 誘導之程度是否有差異 , 並更進一步探討其差異之機理。

第二章、文獻總論

第一節、環境污染物~多環芳香烴類化合物(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)的來源與分佈

PAHs 可由許多物質產生，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.,1994 b,d)。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, 1990; Rothman et al., 1990)和食用油加熱所生成的油煙中也都含有 PAHs 類(Li et al., 1994)。Mumford 等人以 HPLC 分析燃燒煤球的煙霧時，發現含有高量的 benzo[a]anthracene (B[a]A)和 chrysene (Murnfold et al.,1987; Chuang et al.,1992)。後來他們又以 GC/MS 分析該地區烹調時，室內空氣中 PAHs 約含量，發現至少有十種 PAHs 超過 $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ 空氣，依序為 phenanthrene, FA, pyrene, chrysene, B[a]A, benzo[b]fluoranthene (benzo[b]FA), benzo[ghi]perylene(B[ghi]P), 1-methylphenanthrene, B[a]P, anthracene 等，並進一步分析當地居民尿中 PAHs 和 hydroxy PAHs 的含量，發現皆較控制組居民(昆明居民、華裔美國人)尿中 PAHs 和 hydroxy PAHs 的含量多，其中 9-OH-B[a]P 具有統計意義(Mumford et al.,1995)。

曾有學者估計美國每年產生的 benzo[a]pyrene(B[a]P)高達 900-1300 公噸，其中有 37-38%是發電廠在製造能量時產生的，42-46%是由廢棄

物燃燒所生成的，15-19%是在烹調食物過程中產生，至於剩下的 1-1.5% 才是來自汽、機車排放的廢氣(Dipple et. al.,1983)。B[a]P 實際上在環境中的含量分佈為:空氣含有 1-100 ng/m³、河川水含有 10-100 ng/L、一般的飲用水含有 0.1-23 ng/L、土壤中的含量則高於 2000 µg/kg，而食品中的蔬菜、海產生物、燒烤的肉類內之 B[a]P 含量大約為 1-25ug/kg (Dipple et. al.,1990)。而有的學者發現每日從食物攝取到的 B[a]P 含量約達到 30-1,600 ng (Buckley et al., 1992)。

第二節、多環芳香烴類化合物之物化性與生成機制

大多數的 PAHs 皆具有較高熔點及沸點，熔點大都高於 100°C，在常溫下是以固態存在。以 PAHs 的結構而言，由於只含 C、H 原子，亦無官能基，再加上為環狀結構，因此極性和溶解度皆不高。PAHs 的分子構造為平面狀，又具高度的 electron delocation 特性，絕大多數的 PAHs 均帶有很強的螢光放射光譜，可作為螢光偵測辨認。PAHs 中分子量小於 230 g/mole 者，屬於半揮發性物質，在一般大氣溫度範圍下，是以氣固相並存於大氣環境中，其氣相單純以蒸氣型態存在，而固相因大氣中之懸浮微粒提供一良好的表面積，所以會吸附在微粒表面上。

PAHs 由於種類眾多(理論上有數千種 PAHs 被合成，但實際上環境中只有數十種之 PAHs 較重要而為學者們研究的對象)，故彼此間也有差異性存在。整體而言，PAHs 的反應性不高，本身為原污染源 (primary pollutant)，在環境中被認為是較穩定的污染物。雖然 PAHs 的反應性不高，但仍會與大氣中其他強反應物作用，如 NO₂、O₃、自由基等作用或被紫外線解離，參與光化學反應，形成二次污染物(second pollutant)。

PAHs 的形成乃是還原狀態下燃燒烴基物質的結果，目前被接受的形成機制為氣相中自由基反應所造成。主要機制有二：

- (1) 聚合反應(pyrosynthesis)：為低分子量有機物經過聚合作用(polyacetylene)所造成，因有劇烈放熱反應，故可提供足夠能量來解離端邊分子團和自由價電子，來產生穩定的 PAHs。
- (2) 熱解反應(Pyrolysis): 乃高分子有機物經裂解後產生的苯基(phenyl radical)、丁二烯基(butadienyl radical)和苯丁二烯基(Phenyl-butadienyl radical)反應生成 phenanthrene、benzo[a]pyrene 與 fluoranthene。綜合來說在火焰中形成 PAHs 的機制並非唯一性。在飽和氣態火焰中以聚合反應為主。而煤和油滴火焰中，熱解反應則佔優勢。

第三節、多環芳香烴化類化合物之毒性

PAHs 在致癌性方面之研究，早至 1775 年就發現掃煙囪的工人較易罹患陰囊癌。後來許多流行病學調查結果顯示，暴露在混和型之多環芳香烴的工人，罹患腫瘤而致死之機率較其他從業員為高。而在 Bjoreth 等人 (1985) 研究中指出，一般空氣中 PAHs 的含量約有 80% 是來自石化燃料的燃燒，而機動汽機車排放物中之多環芳香烴，在美國的統計，約佔全年排放總量的 36%。通常 PAHs 會經由呼吸道、食道和皮膚接觸進入人體。Brookes 和 Lawley (1964) 證明致癌性之代謝活化物會與皮膚的 DNA 形成 DNA 鍵結物。PAHs-DNA 鍵結物在人類各器官組織都被偵測到，包括肺臟、支氣管、皮膚、胰臟、口腔黏膜、子宮頸和乳房組織等(Dunn and Stich.,1986; Phillips et al.,1988,1990a,b; Everson et al.,1986; Manchester et al.,1988; Seidman et al.,1988; Schoket et al.,1990)。Harris et al.(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 能引起人類和動物細胞的基因發生突變，甚至可能引起人類癌症。另外在動物暴露實驗中發現，TCDD 會在不同動物或組織中誘發專一性之毒性反應，可能造成畸性生長，降低免疫能力，促使表皮組織變形，胸腺的退化，誘導特定酵素表現以及促進腫瘤的生成(Moses, et al.,1985；Suskind, et al.,1985；Vanden, et al.,1993)

第四節、多環芳香烴化類化合物之代謝路徑

(一) 代謝活化

PAHs 在生物體內首先會經由微粒體單氧化酵素系統(monooxygenase)或前列腺素 H 合成酵素(Prostaglandin H synthase)代謝活化成 epoxide，然後會再水解轉變為 diols 型的活化中間產物，此中間產物可與 DNA 共價結合形成 DNA 鏈結物，造成基因突變而引起癌症發生(Dipple et al.,1987)。現在已知致癌物在 DNA 上形成 DNA 鏈結物，而可能是引起基因突變，進而引發癌症發生的重要分子機轉。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 IA1 酵素系統代謝活化先生成 (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[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-tetrahydrobenzo[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.,1976,1977)。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.,1992)。至於在動物體中不同器官組織代謝 B[a]P 的能力有何不同？ Weyand and Bevan (1986)的實驗結果顯示，將 B[a]P 直接噴入老鼠氣管內，五分鐘之後，無論在老鼠的肝臟或是肺臟中都可以測到較高濃度 Quinone 類的 B[a]P 代謝產物，例如：B[a]P-1,6-quinone, B[a]P-3,6-quinone 及 B[a]P-6,12-quinone。而且肺臟中 B[a]P 的代謝速率也比肝臟較為快速。

(二) 解毒路徑

至於 B[a]P 的解毒作用主要是經由 glutathione-S-transferase(GST)，此酵素有許多成員，例如 alpha, mu, theta 以及 pi，而其中在倉鼠細胞內參與 B[a]P 的解毒作用則以 GST pi 為主(Swedmark et al.,1992)。而此型 GST 會與 B[a]P 的最終代謝物 BPDE 進行結合反應 (conjugation reaction)，而抑制其致突變性和致癌性。在人類細胞株和動物細胞的 GST pi 基因表現就有很大的不同，同時在不同的人類細胞之間可能也有些差異(Romert et al.,1989; Moscow et al.,1989; Castro et al.,1990; Lee,S,J. et al.,1994)。

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

(一) AhR 與 Arnt 之功能

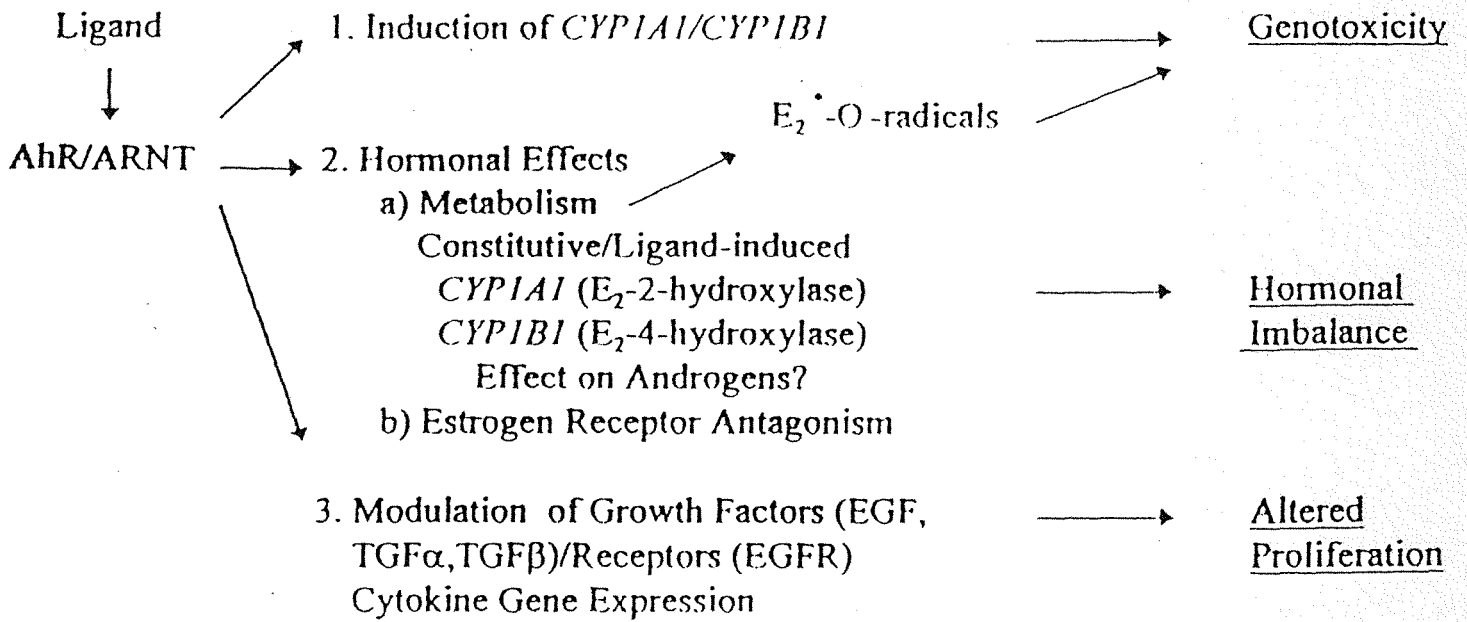
已知 PAHs 會經由活化 AhR/Arnt 來調控 Cytochrome P450 IA1(CYP1A1)、Cytochrome P450 IB1(CYP1B1)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutathione-S-transferases (GST)及 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 基因的表現(Nguyen et al.,1994)。當 PAHs 進入細胞質中會和 AhR 鍵結(Pollenz, et al.,1994)，此時 AhR 上的 heat shock protein (hsp 90)會和 AhR 分離(Pongratz. et al.,1992；Chen. et al.,1995)，接著 PAHs 和 AhR 複合體會進入細胞核中(Okey, A.B. 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 CYP IA1 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、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。

Bigelow and Nebert.(1982)也證明 PAHs 可藉由 AhR/Arnt 的調控，誘導 AHH 的酵素活性。 PAHs 除了藉由 AhR/Arnt 調控 CYP IA1 以外，也會藉由相同的模式調控 CYP IB1 的表現(Hakkola, et al., 1997)。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 的表現，並進一步證實也是藉由 AhR 來調控 fos 和 jun 基因的表現。另外，PAHs 會與 estrogen

receptor 交互作用，影響體內荷爾蒙的表現，造成荷爾蒙失調(Kharat, et al.,1996)；甚至 PAHs 也會調節生長因子(EGF, TGF- α , TGF- β)/Receptor (EGFR)及 Cytokine 基因的表現，而影響細胞的增生(Kevin, et al.,1992) (附錄一)。

另外，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，並沒有造成明顯的傷害，即表示缺乏 AhR 的小鼠可以抵抗 TCDD 所產生的毒物。

附錄一。



(二) AhR 與 Arnt 的結構

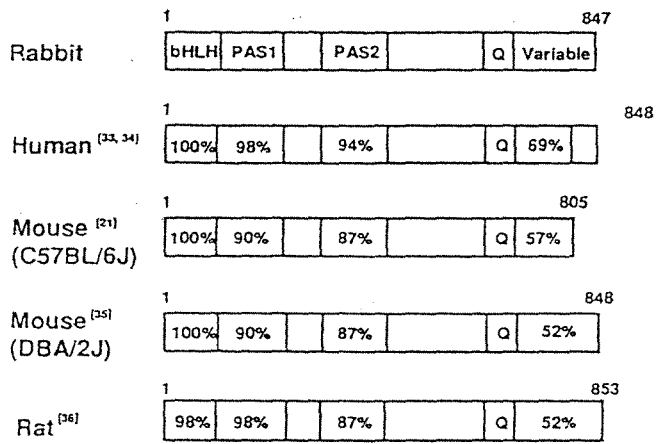
AhR 與 Arnt 的分子量大小，因動物種類不同而各有差異。在兔子的 AhR 含有 847 個胺基酸(Yoshiki, et al.,1996)，在人類為 848 個胺基酸(Itoh, et al.,1993；Dolwick, et al.,1993)，在小鼠(C57BL/6J)為 805 個胺基酸(Ema, et al.,1992)，在小鼠(DBA/2J)中包含 847 個胺基酸(Chang, et al.,1993)，在大鼠中包含 853 個胺基酸(Carver, et al.,1994)；而 Arnt 在兔子中含 790 個胺基酸(Yoshiki, et al.,1996)，在人類中包含 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 的結構和功能極為相似，主要結構分為 3 個部分，以人類 AhR 為例(全長 848 個胺基酸)：第一部份是在 N-terminal 端有一段 basic helix-loop-helix (bHLH) domain (1-112 個胺基酸)，主要是做為和 DNA 鍵結用；第二部份是接在 bHLH 後有一段包含約 260 個胺基酸的片段，稱之為 PAS domain (113-387 個胺基酸)，其中包含 PAS A 與 PAS B，主要是和一些 Ligands (TCDD：2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin；3MC：3-methylcholanthrene； β NF： β -naphthoflavone 等)及 transcription factor(hsp90, Arnt 等)進行 Dimerization；最後一部份，也就是在 C-terminal 端是 Q-rich domain(387- 848 個胺基酸)，主要是控制 transactivation。而以人類 Arnt 為例(全長 789 個胺基酸)：第一部份是在 N-terminal 端有一段 bHLH domain(1-167 個胺基酸)，是與 DNA 鍵結的位置；第二部份是接在 bHLH 後有一段包含約 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，

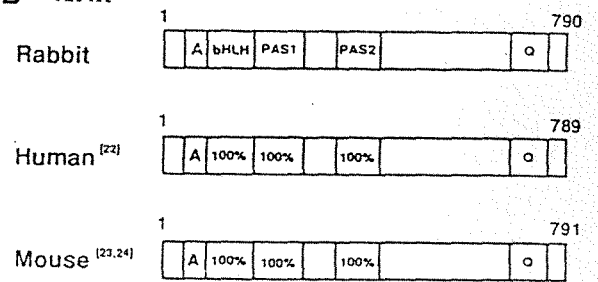
主要是和 AhR 進行 Dimerization；最後一部份，也就是在 C-terminal 端是 Q-rich domain (408-789 個胺基酸)，主要是控制 transactivation 的進行(附錄三)。

附錄二.

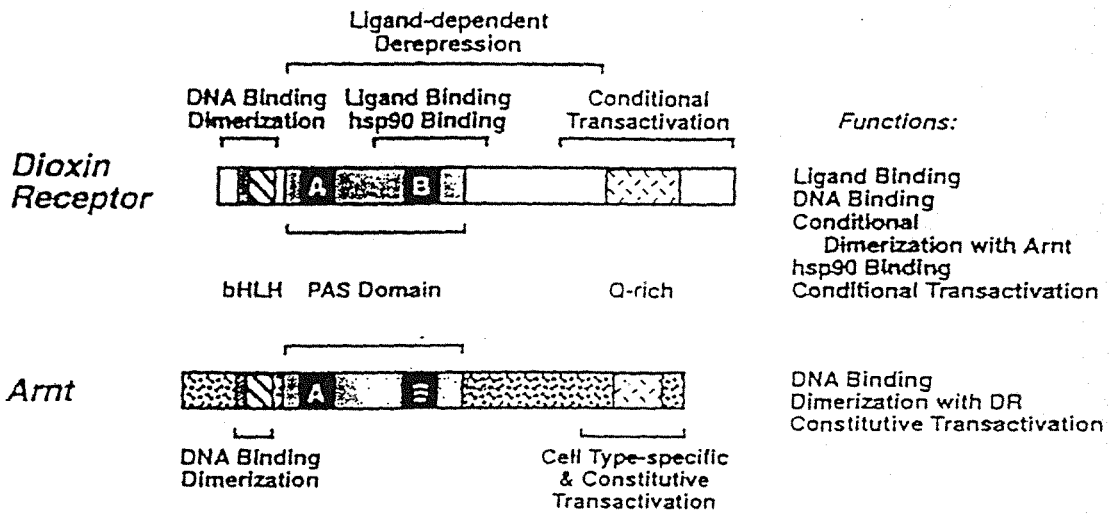
A AhR



B Arnt



附錄三.

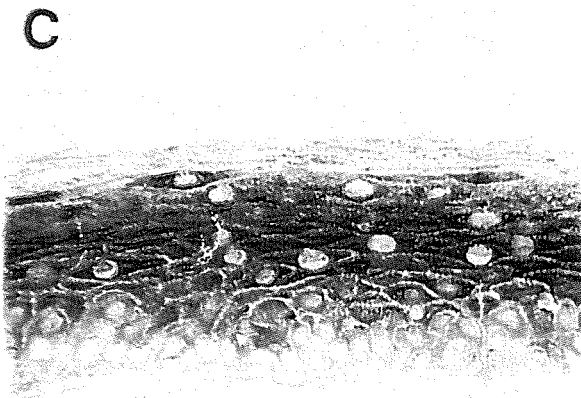
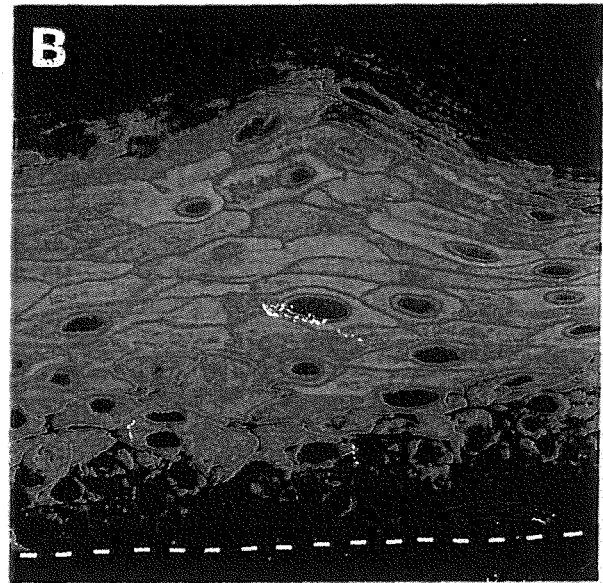
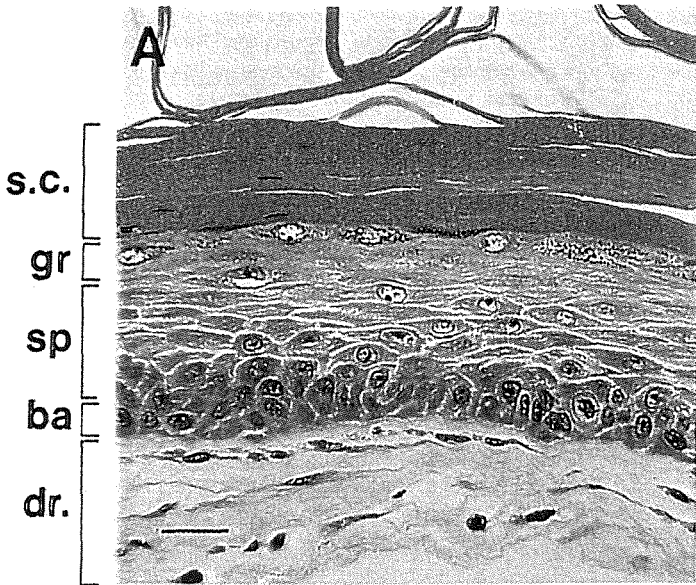


(三)表皮細胞之結構與分化作用

皮膚為抵抗外來物質侵害的第一道防線，可以避免紫外線及空氣中有毒物質直接對人體造成傷害。若皮膚細胞受到傷害，導致不正常的增生或分化，則無法防禦外來物質的侵害，甚至會導致皮膚癌的發生(Gulp and Beland,1994；Higginbotham et al.,1993；Wanner, R. et al.,1995；Corton, J.C. et al.,1996)。

皮膚結構主要分為三層，分別為皮下組織層、真皮層及表皮層，而主要防禦外來物質侵害的是表皮層。表皮層又因細胞分化程度不同，分為四層，由內而外分別為基底層(basal layer, ba)、棘狀層(spinous layer, sp)、粒狀層(granular layer, gr)及角質層(stratum corneum, s.c.)，而細胞分化程度也由內而外遞增。隨著細胞分化程度不同，許多不同種類蛋白依序表現，由 Fuchs 在 1990 年所發表的文獻中，可以清楚看出老鼠皮膚表皮細胞的構造(附錄一.A)，而在利用早期分化指標(K1)及晚期分化指標(involucrin)進行免疫螢光染色後，更可以清楚的判定細胞分化的程度(附錄一.B、C)。附錄一.B 為利用早期分化指標(K1)進行免疫螢光染色後的結果，綠色部分即表示有早期分化指標(K1)的表現，可以看出 K1 在部分基底層有表現，大部分則表現在棘狀層、粒狀層及角質層；附錄一.C 為利用晚期分化指標(involucrin)進行免疫螢光染色後的結果，褐色部分即表示有晚期分化指標(involucrin)的表現，可以看出 involucrin 在部分棘狀層有表現，而大部分表現在粒狀層及角質層。即表示，越外圍的細胞 involucrin 表現程度愈高，角質細胞分化程度也愈高。

附錄四.皮膚表皮的構造



s.c. : stratum corneum

gr : granular layers

sp : spinous layers

ba : basal layer

dr. : dermis

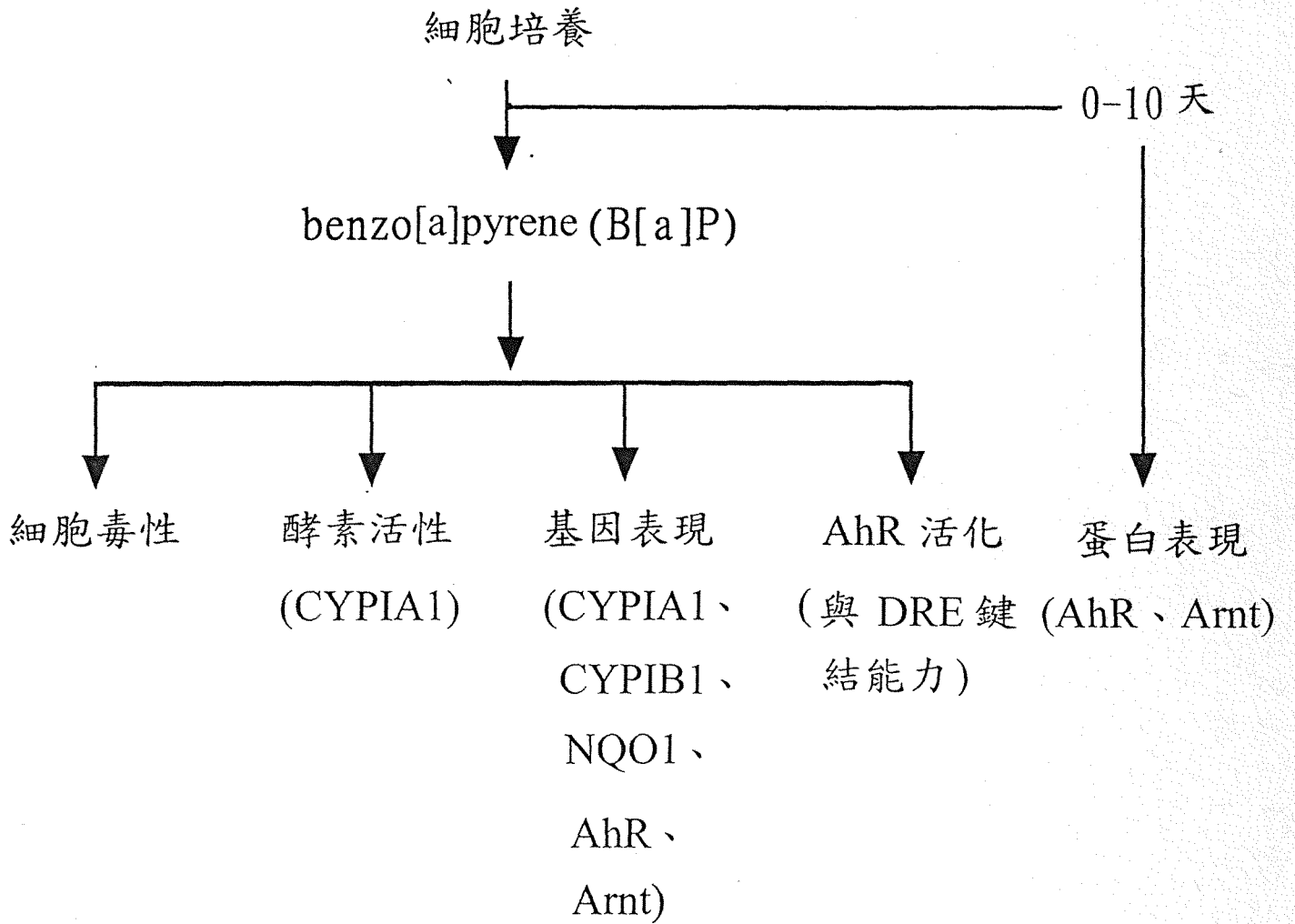
附錄一.為老鼠皮膚表皮細胞的構造(A)，而在利用早期分化指標(K1)及晚期分化指標(involucrin)進行免疫螢光染色後，更可以清楚的判定細胞分化的程度(B、C)

(四)皮膚癌化及分化與 AhR/Arnt 之相關性

前人研究顯示，皮膚表皮層中 AhR 和 Arnt 的功能與皮膚角質細胞癌化有關。將化學致癌物塗抹於小鼠皮膚上產生乳頭狀瘤及鱗狀上皮細胞癌，再以 TCDD 塗抹於病變組織及周邊正常組織 24 小時後，周邊正常組織的 CYP1A1 酵素活性增高，但病變組織的 CYP1A1 酵素活性並未增加(Reiner et al.,1997；1998)。另外，利用化學物質 7,12-dimethylbenz[a,c]-anthracene 與 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (DMBA-TPA)誘導老鼠皮膚產生乳頭狀瘤，在乳頭狀瘤組織中 AhR mRNA 的表現比其周圍正常組織約降低 20 % (Reiner, Jr. et al.,1998)。由此我們可以知道，細胞癌化會影響 TCDD 誘導 CYP1A1 酵素活性的作用，可能細胞癌化也會影響 AhR 與 Arnt 的功能及表現。

另有研究指出，在正常皮膚表皮層中，AhR 和 Arnt 的表現與角質細胞分化程度有關。Wanner 等人(1996)以原位雜交法檢測 AhR 與 Arnt mRNA 在人類表皮層中表現的位置，發現隨著表皮層中角質細胞分化程度愈高，AhR 與 Arnt mRNA 表現量愈多。在完全不分化的基底表皮細胞中，無法偵測到 AhR 與 Arnt 的 mRNA。Paramio 等人(1998)指出，人類皮膚表皮細胞株(HaCaT) 在經過連續 0-20 天的細胞培養後，細胞會持續分化，並且能偵測到分化早期指標(K10)及分化晚期指標(involucrin)的表現；Wanner 等人(1995)指出，人類皮膚表皮細胞株(HaCaT)在經過連續 0-21 天的細胞培養後，AhR 與 Arnt mRNA 的表現增加 85 %。

實驗流程圖



第三章、材料與方法

壹. 材料：

一. 材料與藥品：

RPMI medium 1640 , Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)medium, fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin , sodium pyruvate , non-essential amino acid (NEAA) , glutamine , Super ScriptTM II RT , 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) , (0.4%) trypan blue solution , ammonium persulfate (APS) , tetramethyle ethylenediamine (TEMED) , glutathione , pepstatin A , Aprotinin , β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate (β -NADPH) , Herbimycin , Genistin , 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 ; [³H]-methyl thymidine , [³²P]dATP , anti-rabbit IgG , 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 ; Blue extract (RNA kit)由台灣騰達行股份有限公司購得 ; 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. 人類皮膚細胞株之來源：

人類皮膚基底層癌細胞株(human basal cell carcinoma , BCC)由高雄醫學

院所贈予。人類皮膚表皮細胞株(human immortalized non-tumorigenic keratinocytes, HaCaT)則由德國海德堡 Dr. N. Fusenig 所提供。

貳. 方法

一、細胞培養

BCC 細胞株以含有 3 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine 和 100 unit/ml penicillin/streptomycin 之 RPMI 細胞培養液培養, HaCaT 細胞株則培養於含有 10 % FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine, 100 unit/ml penicillin/streptomycin, 100 μ M sodium pyruvate 及 100 μ M NEAA 之 DMEM 細胞培養液中, 將細胞株置於含 5 % CO₂ 的 37 °C 恆溫培養箱內培養, 每二天更換一次新鮮的培養液, 每種細胞株均約隔三~四盤天培分養, 細胞株培養密度為 2 x 10⁶ 個細胞/10 公分培養皿 (Boukamp et al., 1988. Paramio and Jorcano, 1997)。

二、細胞分盤

首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出, 加入 10 ml 1 倍的 phosphate buffer saline (PBS, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄, 8g/L NaCl, and 2.16g/L Na₂HPO₄) 緩衝溶液洗一下 (HaCaT 細胞株則需用含 0.5 % EDTA 之 1 倍的 PBS 緩衝溶液先浸 1 分鐘), 然後將 1 倍的 PBS 緩衝溶液吸出, 再加入 1 ml 1 倍的 trypsin (為一種內切酶, 能幫助細胞脫離培養皿), 當 trypsin 覆蓋所有細胞後, 即馬上吸出 (盡量吸乾, 因為對細胞會有傷害), 置於 37 °C 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, 我們以 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 15 ml 離心管中(若需進行細胞計數，則可以取一點置於 1.5 ml 離心管中備用)，於 4 °C 離心 900 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 5 分鐘後，將上清液去除(盡量吸乾)，再加入適當細胞培養液，待混合均勻後即可種入培養皿中。

三、冷凍細胞

經確定細胞數後，加入適當的冷凍細胞培養液【以 2 倍的冷凍細胞培養液(50 % 未加血清之細胞培養液, 40 % FBS, 10 % DMSO)與含有血清的一般細胞培養液 1:1 混合】，將細胞稀釋成 $2 - 4 \times 10^6$ 個細胞/ml，以每個冷凍管 1 ml 將細胞移至冷凍管中，再將冷凍管移至保麗龍盒中，先於 -20°C 冷凍 1 小時，再移至 -80°C overnight，隔天隨即將細胞移至液態氮桶中，以確保細胞之完整。

四、解凍細胞

解凍細胞步驟如下：首先，取 9 ml 新鮮的細胞培養液，置於 15 ml 離心管中備用。將細胞自液態氮桶取出(動作要快)，於 37 °C 快速回溫，將冷凍管中之細胞液取出，與 9 ml 新鮮的細胞培養液充分混和，於 4 °C 離心 900 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 5 分鐘後，將上清液去除(盡量吸乾)，再加入 5 ml 新鮮的細胞培養液，待混合均勻後，先種入 6 cm 細胞培養皿中，隔夜隨即更換新鮮的細胞培養液，待細胞長滿後，在將細胞移至 10 cm 細胞培養皿。

五、測定存活細胞數

本實驗是利用 Trypan blue exclusion 方法來檢測細胞存活數目。我們將細胞種在 12-well plate 中，在指定的時間內，測定細胞存活數。首先移去細胞培養液，以 1×phosphate buffer saline (PBS, 0.2g/L KCl、0.2g/L KH_2PO_4 、8g/L NaCl, and 2.16g/L Na_2HPO_4) 先洗一次後，加入 0.5ml trypsin-EDTA (0.05% trypsin and 0.02% EDTA 溶於 PBS)，置於 37°C 培養箱反應 3-5 分鐘，待細胞脫離培養皿，加入 0.5 ml 含 FBS 之細胞培養液去抑制 trypsin 的作用，取 20 μl 的細胞懸浮液加入 5 μl typan blue solution 後混合均勻，在平光顯微鏡下以血球計數器，計數血球計數盤上四個 0.1mm³ 的方格之細胞數，並以此推算出每 1ml 培養液中所含的細胞數。
公式：

$$(1). R = N \times 1/4 \times 25/20 \times 10^4 \times Q$$

【R：細胞存活數；N：血球計數器計數四個 0.1mm³ 的方格之細胞總數；1/4：計數的格數；25/20：即 $\div 20/25$ ，代表微量離心管中細胞所佔的比例；10⁴：一格所代表的體積為 10⁴ 毫升；Q：為細胞培養液的毫升數】

(2). Doubling time：先在生長曲線中取線性關係較好的兩點

$$r = 3.32[(\log N_2) - (\log N_1)] / (t_2 - t_1)$$

$$\text{PDT (Per Doubling time)} = 1 / r$$

【log N₂：較高點之細胞數；log N₁：較低點之細胞數；t₂ - t₁：為兩點之間之時間差】

六、細胞影像攝影

在 BCC 和 HaCaT 細胞株分盤後第三天以及第十天，利用負像倒立顯微鏡 (OLYMPUS-CK40) 觀察細胞型態 (125 X)，再利用照相機

(OLYMPUS-SC35)，將 125 X 倍放大之細胞型態影像攝入(柯達 VX200)彩色底片中既可。

七、細胞增生實驗

此方法是比較細胞經加藥處理 24 小時後，藥物對細胞生長情形的影響。將 5×10^4 個細胞種於 12-well plate 中經隔夜培養後，加以含有不同濃度之藥物的新鮮細胞培養液作用 24 小時後，將含有藥物之培養液移除並加入新鮮細胞培養液，防止藥物與細胞繼續作用，之後每隔二天換培養液並於每天以 typan blue exclusion 方式計數存活細胞數目至四天。

公式：

$$\text{存活率} = (\text{藥物處理組之細胞存活數} / \text{對照控制組之細胞存活數}) \times 100 \%$$

八、RNA 純化

分別將 DMSO(solvent control)、B[a]P $1\mu\text{M}$ 或 B[a]P $10\mu\text{M}$ 加入 BCC 與 HaCaT 細胞培養液中培養 24 小時後以 Blue Extract Kit (LTK BioLaboratories) 抽取 RNA (Chomczynski et al., 1987)。步驟如下：

吸去 2 盤 10 cm 培養皿中舊的培養液，以 1x PBS 洗三次後，加入 1 ml 的 PBS 將細胞刮下，將細胞移至 15 ml 離心管中；於 4°C 離心 900 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 5 分鐘後，將上清液去除(盡量吸乾)，加入 2 ml 的 Blue Extract Kit 於 15 ml 離心管中，再加入 600 μl 的 Chloroform / isoamyl alcohol (49:1)於 15 ml 離心管中，震盪混和後，靜置 5 分鐘，於 4°C 離心 2500 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 30 分鐘，將上清液取出，置於新的 15 ml 離心管中，再加入 800 μl 的 isopropanol，置於 -20°C 約 1 小時以上，使 RNA

沉澱下來後，於 4 °C 離心 2500 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 30 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 °C 離心 2500 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 10 分鐘，將上清液去除(盡量吸乾)，於室溫下風乾。

為了避免 DNA 污染必須再用 DNase 處理，RNA 溶於 200 μ l 1x TE buffer (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA) 與等體積 DNase working solution 混合【20 mM MgCl₂, 2 mM 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°C 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 反應後先以 50 μ l 的 2 M sodium acetate (pH = 4)、500 μ l 的 phenol、100 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol (49:1,v/v) 混合液萃取，接著以 600 μ l 的 chloroform : isoamylalcohol (49:1,v/v) 萃取後，取上清液與等體積 100% isopropanol 於 -20°C 靜置 1 小時沉澱 RNA，離心後 RNA 沉澱物以 75% cold ethanol 洗去殘餘鹽類，最後將 RNA 溶於 30 μ l 之 1x TE 即可。利用螢光分光光譜儀於 excitation = 268nm，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 [0.1% 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。

公式： μ g RNA = 吸光值 (OD 260 nm) \times 40 μ g/ml \times 稀釋倍數

九、製備互補 DNA (cDNA)

混合 20 μg 的 total RNA、2 ng 的 oligo(dT)₁₂ 及 DEPC 處理過的無菌水共 24 μl ，先加熱 70°C 10 分鐘破壞 RNA 二級結構後，立即置於冰上，接著加入 14 μl 緩衝溶液 [50 mM Tris-HCl (pH=8.3)、75 mM KCl、3 mM Mg₂Cl、5 mM DTT、5 mM dNTP] 在 42 °C 先加熱 2 分鐘再加入 400 U MMLV Reverse transcriptase (SuperScript™II, GIBCO)，接著在 42°C 反應 50 分鐘將 mRNA 反轉錄成 c DNA，最後再以 70°C 加熱 15 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 c DNA (total 40 μl) 保存於 -20°C。

十、半定量 RT-PCR (Semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction)

半定量 RT-PCR 主要是利用 c-DNA 為模版，以二對 primer (欲看的基因和 β -actin) 進行 multiple-PCR 反應。半定量 RT-PCR 混合 1 μl cDNA (大約 0.5 μg 的 total RNA)、0.22 μM primer 1 (欲看的基因，primer 序列見附表一)、0.2 μM β -actin primer、200 μM dNTP (GIBCO-BRL, USA)與 1 U Taq polymerase (DyNAzyme™ II, Finland)於 1x 緩衝溶液中 [10 mM Tris-HCl (pH=8.8)、1.5 mM Mg Cl₂、50 mM KCl、 0.1% Triton X-100]，總反應體積為 50 μl 。基因放大反應使用 MJ PTC-200 熱循環儀，反應溫度見附表二。

NQO1 與 CYP1B1 由於無法在同一 PCR 反應裡同時複製放大二段基因，因此每一樣品分別利用不同 primer 在相同的條件下進行基因複製放大。 β -actin 為 internal standard，其表現量不受影響。

定量方式：以 2% 洋菜膠並加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide 於 running

buffer 中電泳，再利用數位化影像分析系統(AlphaImager TM 200，Alpha Innotech corporation) 在 UV 燈下依據染色強度定量。計算公式以 1 μ M B[a]P 對 CYP1A1 mRNA 影響為例：

處理 B[a]P 1 μ M - CYP1A1 定量值 / 處理 B[a]P 1 μ M- β -actin 定量值

處理 DMSO - CYP1A1 定量值 / 處理 DMSO - β -actin 定量值

附表一

Gene	Primer	Reference:
AhR	5'-ATACTGAAGCAGAGCTGTGC -3' 5'-AAAGCAGGCGTGCATTAGAC -3'	Hayashi et al, 1994
Arnt	5'-*CACTTGGGATCC*CGGAACAAGATGACAGCCTAC-3' 5'-*CACTTGGTTCGAC*ACAGAAAGCCATCTGCTGCC -3'	Dehr et al, 1995
CYP1A1	5'- GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3' 5'- AAGACCTCCCAGCGGGCAAT-3'	Hayashi et al, 1991
CYP1B1	5'-AACGTCATGAGTGCCGTGTGT -3' 5'- GGCCGGTACGTTCTCCAAATC-3'	Dehr et al, 1995
NQO1	5'-GGCTGGTTTGAGCGAGTGTTTC -3' 5'-ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG -3'	Traver et al, 1992
β -actin	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA -3' 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC -3'	Dehr et al, 1995

ARNT : 5'-*CACTTGGGATCC*-3'

5'-*CACTTGGTTCGAC*-3'

是為了其它目地而加進 *Bam*HI 與 *Sal* I 的切點，不影響半定量 RT-PCR。

附表二

Gene	Thermocycle Predenature →	conditions Thermocycle →	Further extention	Cycles
CYP1A1	94°C - 3 min	94°C - 50 sec 58°C - 50 sec 72°C - 1 min 10 sec	72°C - 7 min	28
CYP1B1	94°C - 3 min	94°C - 50 sec. 60°C - 50 sec 72°C - 50 sec	72°C - 5 min	28
NQO1	94°C - 3 min	94°C - 50 sec. 58°C - 50 sec 72°C - 1 min	72°C - 7 min	33
AhR	94°C - 3 min	94°C - 1 min. 50°C - 1 min 72°C - 1 min 30 sec.	72°C - 6 min	34
Arnt	94°C - 3 min	94°C - 1 min. 51°C - 1 min 72°C - 1 min 20 sec.	72°C - 5 min	31

十一、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，加藥處理不同時間後，移除培養液，以 10 ml 1×PBS 洗兩次，並加入 1 ml 1×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°C 7,000 rpm (SORVALL RMC 14) 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.)均質化後，離心於 4°C 12,500 rpm (SORVALL RMC 14) 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 μg 及 1 ml 之緩衝液(0.1 ml 1M HEPES, 10 μl 40 mM NADPH, 1 μl 1 M MgCl₂)，震盪混和後，靜置 2 分鐘，再加入 20 μl 1 mM B[a]P 於 37°C 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，離心於室溫下 900 rpm (Beckman GPR Centrifuge) 5 分鐘，去除上層液，以螢光分光光譜儀於 excitation=396nm，與 emission=522nm 時測其吸光值並與已知濃度的 3-OH B[a]P 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 形成量 pmol/min/mg protein。

公式：

$$eq = \text{標準品吸光值} / \text{標準品濃度 (ng/ml)}$$

$$Fu = \text{樣品吸光值} - \text{標準品吸光值}$$

$$\text{CYP1A1 酵素活性} = Fu/eq \times 2\text{ml} \times 2 \times (100/80) \times 1/268.3 \times 1000 \times 1/\text{mg protein}$$

十二、Papanicolaou's 染色

本實驗的目的是利用細胞分化程度不同其細胞膜通透性不同的原理，對細胞進行染色，以判定細胞分化程度。我們將細胞種在 12-well plate 中，經過 3-10 天培養後，先用 95 % 酒精將細胞固定在培養皿上，再用一系列降調酒精洗去培養皿上的固定液(因為染細胞核的染劑—Hematoxyline 是水溶性的)。接著用 Hematoxyline 來染細胞核，時間為 6 分鐘，再用一系列升調酒精處理，以去除水分(因為染細胞質的染劑—OG-6 及 EA-50 都是酒精溶液)。接著用 OG-6 及 EA-50 來染細胞質，最後用絕對酒精脫水，再用 Xylol 處理，使培養皿上細胞清晰透明，便於鏡檢觀察。OG-6 的分子量為 350，當它先染時不論細胞膜上之裂孔大或小，它都能進入，隨後進行之 EA-50 染色因所含 Eoaine 分子量為 692，Light green 分子量為 793，都比 OG-6 大得多，因此 EA-50 無法進入細胞膜上裂孔較小之細胞如角化扁平上皮細胞內，所以這種細胞之細胞質就由 OG-6 染色成橘黃色。而細胞膜上裂孔較大之細胞如深層扁平上皮細胞，可被 EA-50 進入，EA-50 顆粒較大，具有較強的靜電負荷，因此可取代 OG-6 而與細胞質結合，因而使這種深層扁平上皮細胞被染色成藍綠色。

十三、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, 0.002 % KCl, 0.14 % Na_2HPO_4 , 0.02 % KH_2PO_4)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°C 低速離心 7000 rpm (SORVALL RMC 14) 5 分鐘後，除去上清液，加入 0.5 ml 2 x LYSIS 緩衝溶液(50 mM HEPES pH= 7.4, 10 mM EGTA, 40 mM Sodium molybdate, 20 % glycerol, 6 mM MgCl_2 , +/- 1 % NP-40, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin,

10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin A, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 50 $\mu\text{g/ml}$ TLCK, 50 $\mu\text{g/ml}$ TPCK), 重新懸浮, 並保持在 4°C 中。

利用 SONICS & MATERIALS INC. VCX 600 (購至 DANBURY, CT. U.S.A.) 製備細胞均質液。首先, 將 Sonicator 之 TUNE: 調整到 10; Ample: 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 100 mM PMSF 5 μl (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 (SORVALL RMC 14) 離心 10 分鐘後, 將上清液移至新的微量離心管中, 留 50 μl 用來測蛋白量, 其餘的以 1:1 的比例和 2 X 的樣品緩衝溶液混合, 再置於 100 °C 沸水中 denature 5 分鐘, 並以 BCA protein assay 定量蛋白量。

十四、細胞核、質分離之蛋白萃取

細胞生長於 10 公分的培養皿待生長至七、八分滿時, 以 PBS 緩衝液(0.8% NaCl, 0.002% KCl, 0.14% Na_2HPO_4 , 0.02% KH_2PO_4)洗三次, 再以 0.9ml HEGD 緩衝液(25 mM HEPES, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH= 7.6; 0.5 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin)刮下細胞, 至於 1.5 ml 微量離心管中, 以低速離心於 4°C 7000 rpm(SORVALL RMC 14) 10 分鐘後, 取細胞沉澱物加入 0.5 ml HED (HEGD without glycerol)混合均勻後, 靜置 10 分鐘, 再以玻璃細胞研磨器 (micro tissue grinder, Wheaton 公司) 來研磨細胞(約 40 下), 以 typan blue 檢測細胞膜是否已磨破, 再於 4°C 7,000 rpm (SORVALL RMC 14) 10 分鐘離心後, 將上層液(為細胞質)與沉澱物(為細胞核)分開。將上層液(細胞質)於 4°C 7,000 rpm (SORVALL RMC 14) 離心 30 分鐘後, 將上清液移

至新的微量離心管中，再加入等量 sample buffer (1 : 1)，置於 100 °C 沸水中 denature 5 分鐘；於沉澱物(細胞核)中加入 500 μ l HED buffer (washing 用)，在 4°C 7,000 rpm (SORVALL RMC 14) 離心 10 分鐘後，除去上清液，加入 250 μ l HED buffer，混合均勻後再加入 250 μ l sample buffer (1 : 1)，置於 100 °C 沸水中煮沸 5 分鐘，並以 BCA protein assay 定量細胞核、質內蛋白量。

十五、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(U300)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(1mg/ml 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°C 培養 15 分鐘，以分光光度儀(U300)於波長 562 nm 測吸光值，再利用線性回歸分析與標準品(1mg/ml BSA)比較以求得待測物之蛋白濃度(μ g/ μ l)。

十六、西方墨點法

首先製備上膠 4 % (1.56 ml upper gel buffer, 0.6 ml 40% acrylamide-bis acrylamide, 120 μ l 10% ammonium persulfate, 3.73 ml 蒸餾水, 12 μ l TEMED)、下膠 8 % (2.5 ml lower gel buffer, 2 ml 40% acrylamide-bis acrylamide, 120 μ l 10% ammonium persulfate, 5.4 ml 蒸餾水, 20 μ l TEMED) 之直立式 mini acrylamide-bis acrylamide 膠，以每個 well loading 20 μ g 的樣品，先用 140 volt 跑 10 分鐘，再用 120 volt 跑 80 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，shake 5 分鐘。利用 Bio Rad-Mini Trans-Blot Cell 以 100 volt、60 分鐘，將膠上的蛋白轉移到 PVDF membrane 上。將 transfer 好的 PVDF membrane 浸在含 5% 脫脂奶粉(skim milk)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。如欲看 AhR 則可在 blocking 的溶液中加入 Histidine(0.1 g/30 ml TTBS-milk)，以避免 nonspecific band 產生。再加入可辨識欲觀察之蛋白的一次抗體(anti-mouse-AhR : 1000 X 稀釋，4°C overnight; anti-rabbit-AhR : 2 μ g/ml，室溫 1.5 小時; anti-rabbit-Arnt : 1 μ g/ml，室溫 1.5 小時; anti-mouse- β -actin : 100000 X 稀釋，4°C overnight or 室溫 1.5 小時; anti-mouse-involucrin : 5000 X 稀釋，室溫 1 小時; anti-mouse-K1-K10 : 1,000,000 X 稀釋，室溫 1 小時)，抗體皆由 1 X-TTBS-milk 稀釋(K1-K10 由 1 X-TTBS 稀釋，不需用牛奶)，且在加入 1/100 的 2 % sodium azide 後保存於 4°C，可回收再利用。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 or anti-rabbit 之二次抗體反應 1 小時。將處理完二次抗體之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉 (skim milk) 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，再用不含脫脂奶粉 1 X-TTBS⁺ 緩衝溶液清洗兩次。最後用 1 X-PBS 緩衝溶液 (0.8 % NaCl, 0.002 % KCl, 0.14 % Na₂HPO₄, 0.02 % KH₂PO₄) 稍微洗一下，即可利用 E.C.L. 呈色劑 (Amersham RPN 2106)，將經過抗體作用之蛋白影像呈現在 X-光底片 (Kodak Science Imaging Film) 上，約 5-30 分鐘。

十七、Gel retardation assay (Merchant et al., 1993)

本實驗是在測核蛋白與 ³²P 標定的 Dioxin responsive element (DRE) 鍵結的能力。細胞生長於 10 公分的培養皿待生長至七、八分滿時以 0.9ml HEGD 緩衝液 (25 mM HEPES, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH= 7.6; 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin) 刮下細胞，以低速離心於 4°C 7,000 rpm (SORVALL RMC 14) 5 分鐘後，取細胞沉澱物加入 0.5 ml HEG (HEGD without glycerol) 混合均勻後，以玻璃細胞研磨器 (micro tissue grinder, Wheaton 公司) 研磨細胞約 40 下，離心於 4°C 7,000 rpm (SORVALL RMC 14) 10 分鐘後去除上層液，於細胞沉澱物中加入 100 µl HEGD-KCl (HEGD buffer and 0.5 M KCl) 混合均勻後，在 4°C 振盪 1 小時，再離心於 4°C 14,000 rpm (SORVALL RMC 14) 30 分鐘後收集上清液，並以 Bio-Rad protein assay 定量蛋白量，取 15 µg 上清液和 15 µl HEGD 緩衝液及 2 µl of 1 µg/µl poly d(I-C) 及 2 µl of 20 pg/µl ³²P 標定的 (2 x 10⁴ cpm/µl) DRE 片段混合後加入 5 % acrylamide-gel (5 ml of 40% acrylamide, 4 ml of 10× Tris-glycine, 2 ml of 100% glycerol, 29 ml of 蒸餾水, 100 µl of 10% ammonium persulfate)，以 120 V 電泳 3 小時後，

將膠烘乾後，以 X-光底片(Kodak Science Imaging Film)感光 10-16 小時後既可顯影。

十八、統計分析

本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-test* 加以分析，並檢測其差異性。*Student 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。

第四章、實驗結果與討論

第一節、BCC 和 HaCaT 細胞株，細胞型態及分化程度之比較

首先我們比較 BCC 與 HaCaT 細胞的型態及分化程度。人類皮膚基底層癌細胞株(human basal cell carcinoma, BCC)與人類皮膚表皮細胞株(human immortalized non-tumorigenic keratinocytes, HaCaT)分盤後培養第三天以及第十天，我們利用負像倒立顯微鏡(OLYMPUS-CK40)觀察這兩株細胞外在的型態(125 倍放大)，並利用照相機(OLYMPUS-SC35)，將 125 倍放大之細胞型態影像攝入彩色底片(柯達 VX200)中。圖一.A.為人類皮膚基底層癌細胞株(BCC)與人類皮膚表皮細胞株(HaCaT) 培養 3 天後之細胞型態。人類皮膚基底層癌細胞株(BCC)細胞型態較小，且呈現角狀；而人類皮膚表皮細胞株(HaCaT)細胞型態較大，呈不規則狀，且向外伸張。圖一.B.為 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株連續培養 10 天後之細胞型態。BCC 細胞株之上層細胞大多呈圓球狀，並無層層疊疊的現象；而 HaCaT 細胞株之上層細胞不但可以貼附，還有層層疊疊的現象，並在某一區域形成類似圓丘的形狀。已知分化後之皮膚角質細胞能分層疊在基底細胞的上層(Roop et al.,1987)，因此，由兩株細胞外在的型

態來看，HaCaT 細胞株之細胞分化程度似乎較 BCC 細胞株來的高。

Paramio 等人.(1998)指出，人類皮膚表皮細胞株 (HaCaT) 連續 0-20 天的細胞培養後，細胞會持續分化，在某一個區域形成類似圓丘的形狀。人類皮膚主要分為真皮層及表皮層，而表皮層又因分化程度不同，分為基底層、棘狀層、粒狀層及角質層，並可進一步利用早期分化指標 (K1) 及晚期分化指標 (involucrin) 的表現，來判定細胞分化之程度(越上層的，細胞分化程度越高) (Fuchs, 1990)。

另外，Ayoub and Shklar 在 1963 年的報告中指出，可以利用 Trichrome-staining procedure 的方式，依細胞分化程度不同，其細胞膜通透性不同的原理，對細胞進行染色，藉以判定細胞分化程度。

因此，我們進一步利用 Papanicolaou's stain 和分化早期指標 (K1-K10) 以及分化晚期指標 (involucrin) 蛋白的表現，來探討這兩株細胞分化程度是否有差異。在 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株培養 3 天或 10 天後，以 Papanicolaou's stain 及西方墨點法檢測 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株中細胞染色的情形以及 K1-K10 和 involucrin 蛋白的表現，以判定這兩株細胞分化的程度。由圖二.A 可以看出，BCC 和 HaCaT 細胞株培養 3 天後，皆可由分子量較大的染劑---EA-50 所染色，而呈現藍綠色，在 HaCaT 細胞株中有少許細胞可由分子量較小的染劑---OG-6 所染色，而呈現橘黃色；經過 10 天培養後，

BCC 細胞株皆被 EA-50 所染，而呈現藍色，而 HaCaT 細胞株中形成圓丘的部分，很明顯呈現橘黃色。由圖二. B 可以看出，BCC 和 HaCaT 細胞株皆表現早期分化指標 (K1-K10) 蛋白，但 BCC 細胞株並沒有晚期分化指標 (involucrin) 蛋白的表現(圖二.B); involucrin 蛋白在 HaCaT 細胞株中的表現程度，會隨著培養天數而增加。以上的結果表示，HaCaT 細胞株隨著培養時間越久，分化程度越高。而 BCC 細胞株分化程度比 HaCaT 細胞株低。因此 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株除了細胞型態不同外，這兩株細胞分化程度亦有所不同。

McCance 等人在 1988 年的報告中指出，人類皮膚鱗狀上皮癌中，細胞進行分化作用的能力較低，但可以檢測到有早期分化指標(K1-K10)的表現。而 Paramio 等人在 1998 年的報告中指出，人類皮膚表皮細胞株(HaCaT)在培養 0-20 天期間，細胞會持續分化，早期分化指標(K10)及晚期分化指標(involucrin)會隨細胞培養天數增加，而持續表現，但是表現的程度並不盡相同，以 involucrin 的表現較強。另外，Gaido 等人在 1994 年的報告中指出，可藉由 Trichrome-staining procedure 的方式，對人類皮膚表皮細胞進行染色，並判定其分化程度。由以上的文獻可以支持本實驗的結果：這兩株皮膚細胞分化程度不同，BCC 屬於癌化的皮膚基底層的細胞，細胞分化程度較

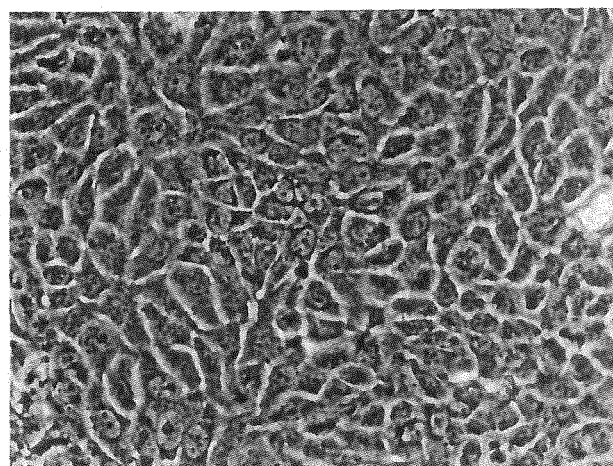
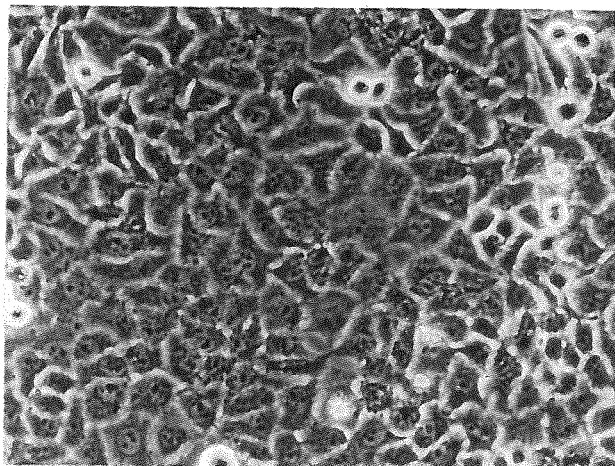
低，失去分化的能力，而 HaCaT 雖然是 immortalized 細胞，但仍具有正常細胞分化的能力。

[A]

BCC

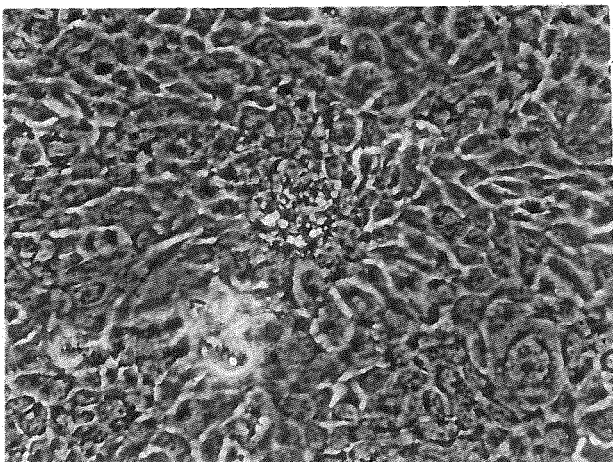
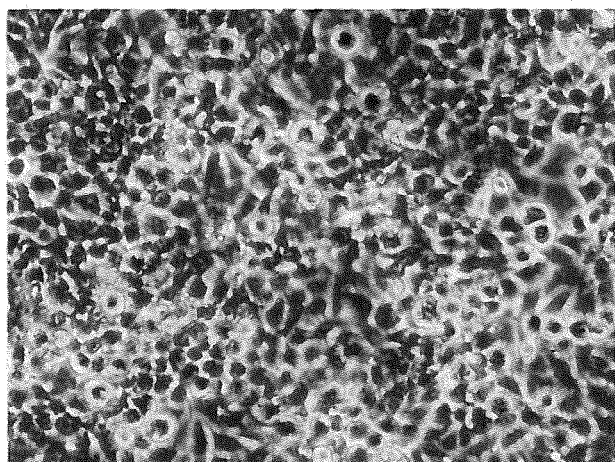
HaCaT

3 天



[B]

10 天



圖一. 細胞培養 3-10 天後，經由顯微鏡 125 X 放大，觀察 BCC 和 HaCaT 細胞株之細胞型態

A. 為 BCC 和 HaCaT 細胞株培養 3 天後之細胞型態。

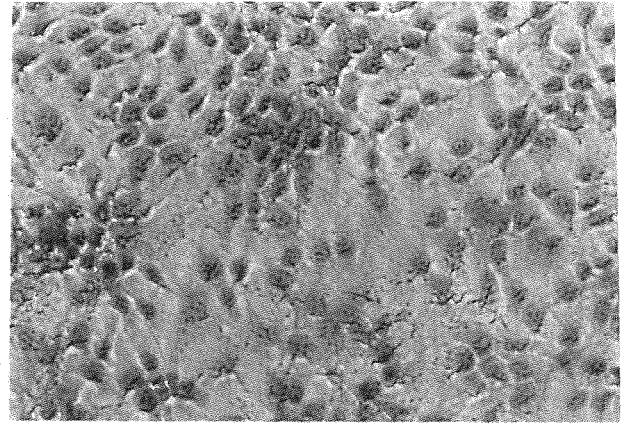
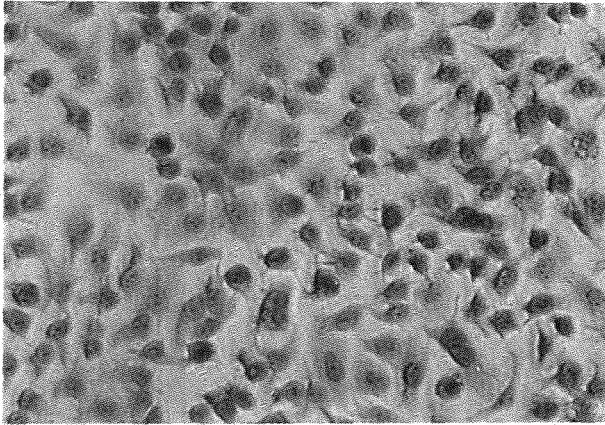
B. 為 BCC 和 HaCaT 細胞株培養 10 天後之細胞型態。BCC 細胞株之上層細胞大多呈圓球狀，並無層層疊疊的現象；而 HaCaT 細胞株之上層細胞不但可以貼附，並有層層疊疊的現象，且在某些區域會形成類似圓丘的形狀。

[A]

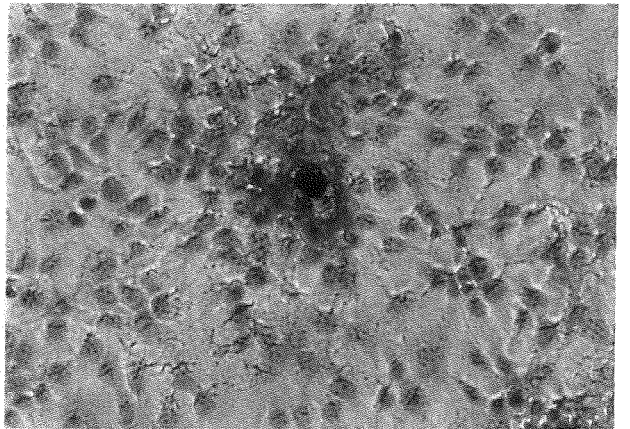
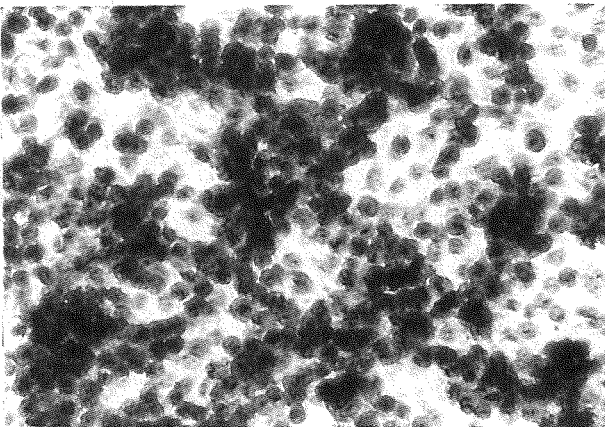
BCC

HaCaT

3 天



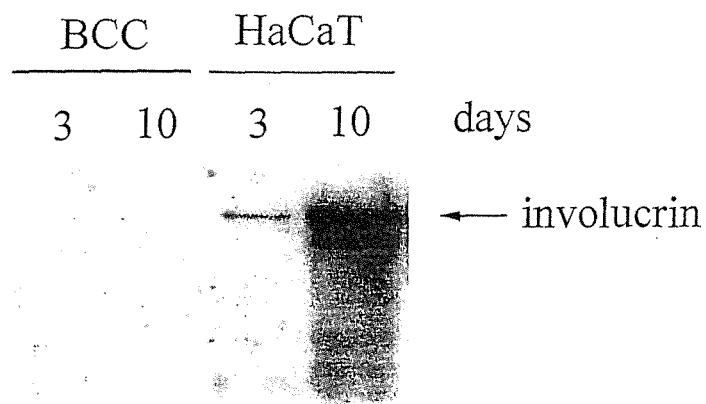
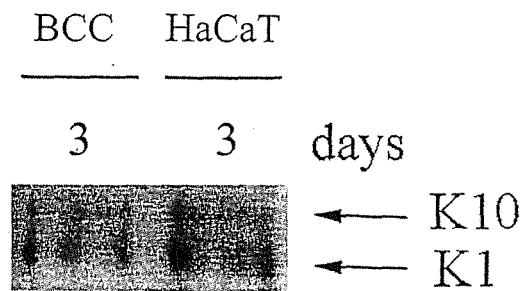
10 天



圖二. 利用 Papanicolaou's stain 以及早期分化指標 (K1-K10) 和晚期分化指標 (involucrin) 蛋白的表現, 檢測 BCC 和 HaCaT 細胞株之分化程度

A. 為細胞培養 3 天或 10 天後進行 Papanicolaou's stain。結果發現, 在細胞培養 3 天後, 兩株細胞皆可被 EA-50 所染到(藍綠色), 而有少許 HaCaT 細胞株被 OG-6 所染到; 在細胞培養 10 天後, 只有 HaCaT 細胞株可被 OG-6 所染到(橘黃色)。

[B]

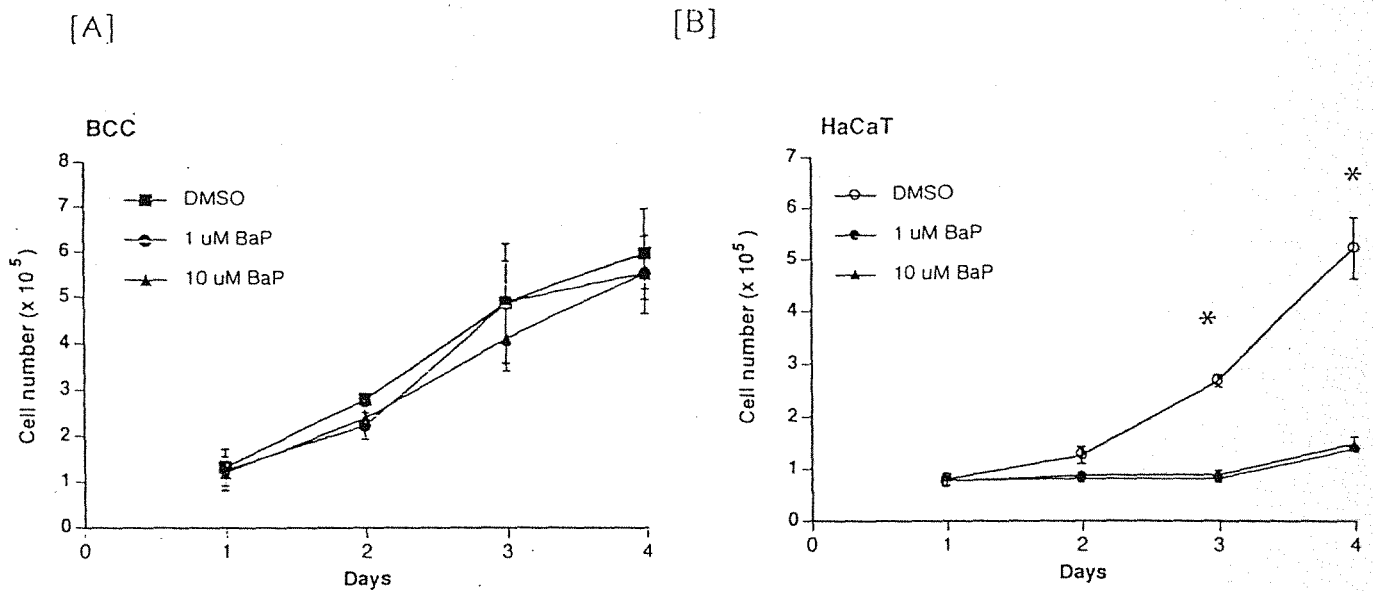


B. BCC 和 HaCaT 細胞株皆表現早期分化指標 (K1-K10) 蛋白，但 BCC 細胞株並沒有晚期分化指標 (involucrin) 蛋白的表現；involucrin 蛋白在 HaCaT 細胞株中的表現程度，會隨著培養天數而增加。

表示，HaCaT 細胞株隨著培養時間越久，分化程度越高。而 BCC 細胞株分化程度比 HaCaT 細胞株低。

第二節、B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株生長之影響

B[a]P 是一種能導致皮膚癌的多環芳香烴類化合物，於是我們比較人類皮膚基底癌細胞株(BCC)與人類皮膚細胞株(HaCaT)對 B[a]P 敏感性之差異。首先將 5×10^4 個細胞種入 24-well plate 中，在培養 24 小時後，分別加入不同劑量之 B[a]P，經過 24 小時培養後更換為不含 B[a]P 之新鮮培養液，繼續培養四天，四天期間每天以 trypan blue 染色法測定存活細胞數目。由圖三.A、B 的對照組生長情形可知 BCC 和 HaCaT 細胞株之 doubling time 分別為 26.52 和 23.32 小時。當 HaCaT 細胞株經 1 μ M 或 10 μ M B[a]P 處理 24 小時後，在第四天的存活細胞數目，已降為對照組的 29.1%與 23.7% (經 t test 分析，P 值 <0.01)；但是 BCC 細胞株在第四天的存活細胞數目，尚為對照組的 92.6%與 92.3%，由上述結果可知 B[a]P 對 BCC 細胞株並無抑制細胞生長之作用，而 B[a]P 可抑制 HaCaT 之細胞生長，即表示正常的 HaCaT 細胞株對 B[a]P 較為敏感，但癌化的 BCC 細胞株對 B[a]P 沒有反應。



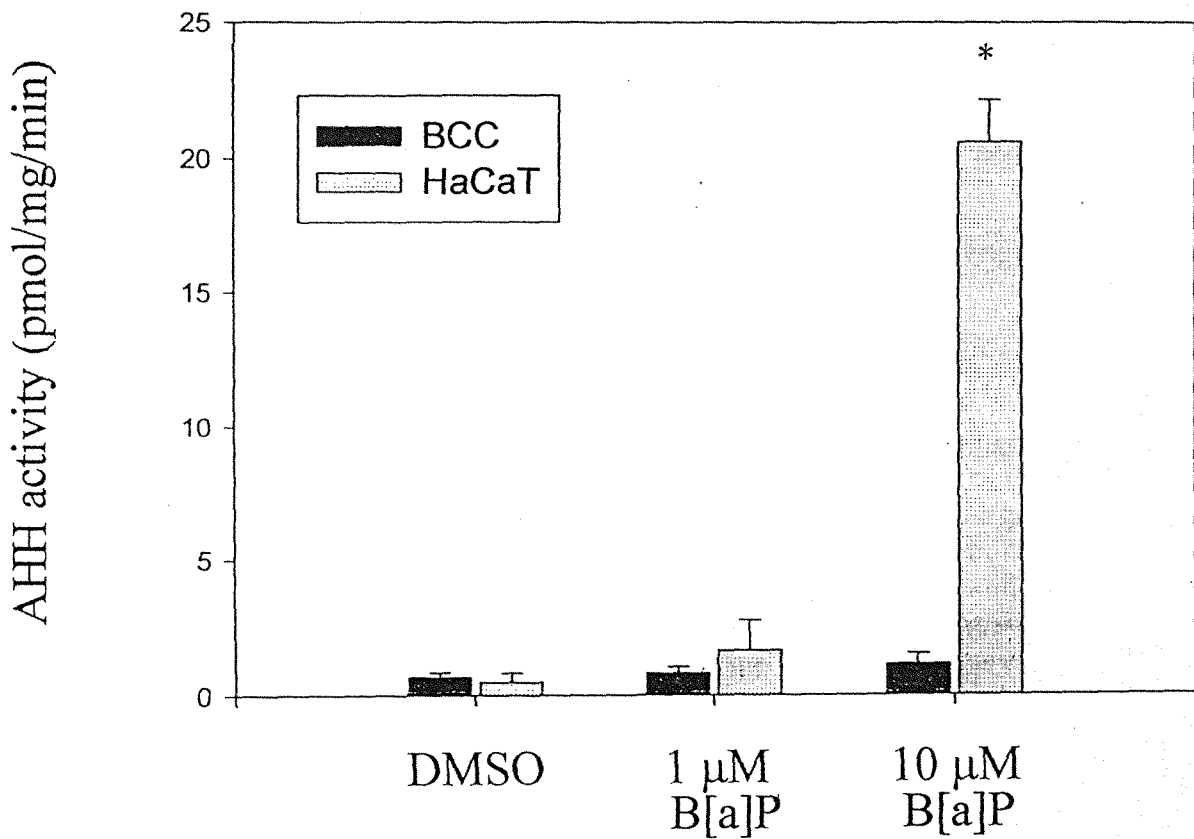
圖三. B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株生長之影響

將 BCC 和 HaCaT 細胞株處理 1 或 10 μM B[a]P 連續培養 24 小時後，換成不含 B[a]P 之新鮮營養液，繼續培養四天，四天期間每天以 trypan blue assay 計算存活細胞數。結果發現，B[a]P 會抑制 HaCaT 細胞株的生長（圖三. A），第四天存活率約 30%（經由 T test 分析，P 值 < 0.01）；但並不會抑制 BCC 細胞株的生長（圖三. B），第四天存活率約 90%。BCC 細胞株的 (doubling time) 倍增時間為 26.52 小時；HaCaT 細胞株為 23.32 小時。

第三節、B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中誘導 CYP1A1 酵素活性之程度

我們已知 CYP1A1 參與 B[a]P 的代謝活化，且 B[a]P 本身會誘導 CYP1A1 的表現，而由圖三知 BCC 和 HaCaT 這兩株細胞對 B[a]P 的敏感性不同。因此，本實驗欲瞭解 B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 兩株細胞中誘導 CYP1A1 酵素活性是否有差異。因此將 BCC 和 HaCaT 細胞處理不同濃度 B[a]P 24 小時後，以 AHH 方法測量 CYP1A1 酵素活性。結果發現，HaCaT 細胞株經過 1 μ M 或 10 μ M B[a]P 處理 24 小時後，CYP1A1 酵素活性由 0.475 pmol/mg/min 上升至 20.600 pmol/mg/min (約 40 倍) (經 t test 分析，P 值<0.01)，而 B[a]P 誘導 BCC 細胞株之 CYP1A1 酵素活性的能力則較低(約 2 倍) (圖四.)。由此可知，B[a]P 在 HaCaT 細胞株中誘導 CYP1A1 酵素活性的能力較高。因此 B[a]P 對這兩株細胞誘導 CYP1A1 酵素活性的能力不同，可能導致 HaCaT 細胞株對 B[a]P 敏感性較高，而 BCC 細胞株對 B[a]P 敏感性較低。

Bigelow and Nebert (1982) 已證明 PAHs 可藉由活化 AhR 及 Arnt，誘導 CYP IA1 基因表現，增加 CYP IA1 的酵素活性。因此，我們進一步比較 AhR 與 Arnt 基因和蛋白在 BCC 與 HaCaT 細胞中表現程度。



圖四. B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中誘導 CYP1A1 酵素活性之能力

將 BCC 和 HaCaT 細胞株處理 1 或 10 μM B[a]P 連續培養 24 小時後，以 AHH 方式測定酵素活性。結果發現，B[a]P 誘導 HaCaT 細胞株之 CYP1A1 酵素活性高達對照組的 40 倍(經由 T test 分析，P 值 < 0.01)；而 B[a]P 誘導 BCC 細胞株之 CYP1A1 酵素活性的能力則較低(約只增加 2 倍)。

第四節、B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株之 CYP1A1、 CYP1B1、NQO1、AhR 與 Arnt 基因表現的影響

一、B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株中 CYP1A1 基因表現的影響

BCC 為癌化的皮膚細胞而 HaCaT 為正常而有分化能力的皮膚細胞，經本實驗室的研究結果顯示 B[a]P 在 HaCaT 細胞誘導 CYP1A1 酵素活性之能力比 BCC 細胞強。此結果與 TCDD 在小鼠皮膚腫瘤組織活化 CYP1A1 酵素之程度比在正常皮膚組織的程度為高的結果相類似(Reiner et al.,1997；1998)。我們進一步探討 B[a]P 在二株細胞中誘導 CYP1A1 基因表現之程度是否有差異。

我們使用 RT-PCR 方式半定量 CYP1A1 mRNA，CYP1A1 的 RT-PCR 產物大小為 210 bp， β -actin RT-PCR 產物大小為 541 bp。在處理 DMSO (溶劑對照組)的細胞株，皆無法明顯偵測到 CYP1A1 mRNA 的表現，在 BCC 細胞株處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後 CYP1A1 基因表現並沒有明顯增加。而 HaCaT 細胞株處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後，與處理 DMSO(溶劑對照組)的 HaCaT 細胞株比較 CYP1A1 基因表現增加 8 倍以上。可知 B[a]P 可以誘導 HaCaT 細胞株 CYP1A1 基因的表現，但是 BaP 不能誘導 BCC 細胞

株 CYP1A1 基因的表現(圖五.)。

Reiners 等人在 1998 年的研究中指出，在小鼠皮膚腫瘤周圍正常組織中發現，TCDD 可誘導 CYP1A1、CYP1B1、aldehyde dehydrogenase 4, (AHD4)及 NAD(P)H:menadione oxidoreductase (NMO1)的表現，而在腫瘤組織中這些基因被誘導的程度並不高。我們的實驗結果與之相類似：在 HaCaT 細胞株(非癌化的皮膚細胞)中 B[a]P 會誘導 CYP1A1 基因的表現，但是在 BCC 細胞株(已癌化的皮膚細胞)中 B[a]P 並不會誘導 CYP1A1 基因的表現。

二、B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株中 CYP1B1 基因表現的影響

因為在某些細胞株，CYP1B1 基因也會被 B[a]P 經由類似 CYP1A1 誘導的機理所誘導(Savas and Jefcoate, 1994)，而且 CYP1B1 也參與 B[a]P 的代謝活化(Franzen et al.,1988)，所以我們也比較這兩種細胞株中，B[a]P 是否能誘導 CYP1B1 基因的表現。

CYP1B1 RT-PCR 產物大小為 360 bp， β -actin RT-PCR 產物大小為 541 bp。在處理 DMSO (溶劑對照組)的細胞株，HaCaT 細胞株中 CYP1B1 mRNA 表現量比 BCC 細胞高。BCC 細胞株在處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後 CYP1B1 基因表現並沒有明顯增加。而 HaCaT 細胞株在處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後，CYP1B1

基因表現也一樣並沒有明顯增加。由此可知，CYPIB1 基因在 HaCaT 細胞中表現程度較 BCC 細胞高，但是 CYPIB1 基因在兩株皮膚細胞中皆無法被 B[a]P 所誘導(圖五.)。

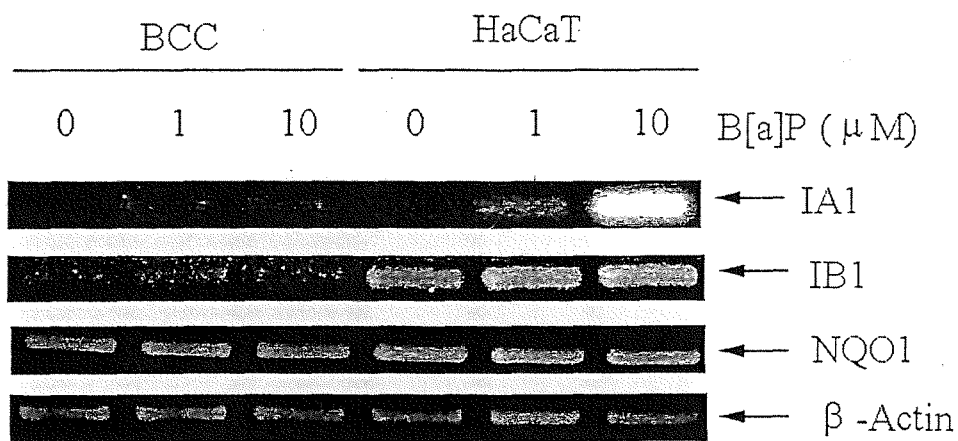
多環芳香類化合物除了由 CYP1A1 代謝活化外，人類 CYPIB1 亦參與多環芳香類化合物、arylamines 等 procarcinogen 與 promutagens 的代謝與活化(Shimada, et al, 1996)，CYPIB1 mRNA 主要分佈於肝外組織，如：淋巴球、子宮內膜、支氣管灌洗液細胞及胎盤 (Hakkola, 1997)。人類 CYPIB1 基因的 promoter 含有 DRE，可被 TCDD 所誘導(Tang et al, 1996)，雖然 CYPIB1 表現可經由 AhR 調控(Hakkola, 1997)，有研究指出 TCDD 誘導 CYPIB1 基因表現具有細胞特異性(Kress, 1997)，並不是每種細胞在處理 TCDD 後都會經由 AhR 同時調控 CYP1A1 與 CYPIB1 基因表現。本研究結果顯示，雖然 CYPIB1 基因表現在皮膚細胞中無法被 B[a]P 所誘導，但在正常皮膚細胞中 CYPIB1 基因不必經過外來物質誘導即有明顯表現，因此 CYPIB1 在正常皮膚細胞的代謝功能上，應扮演一個重要的角色。

三、B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株中 NQO1 基因表現的影響

已知 NQO1 基因的 promoter 上也有 DRE (Jaiswal, et al.,1991), NQO1 在某些細胞中亦能經由類似 CYP1A1 的方式所誘導, 因此我們也希望了解在這兩種細胞株中 B[a]P 是否也會影響 NQO1 基因的表現。

NQO1 RT-PCR 產物大小為 268 bp, β -actin RT-PCR 產物大小為 541 bp。二個細胞株 NQO1 基因的表現量很高, 二細胞株處理 1 μ M B[a]P、10 μ M B[a]P 24 小時後與處理溶劑對照組(DMSO)比較, NQO1 基因表現程度沒有顯著差異(圖五.)。由此可知, B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中不會誘導 NQO1 基因表現。

已有研究指出, HepG2 細胞的 NQO1 基因 promoter 含有 DRE, 細胞經 TCDD 處理後 NQO1 基因的轉錄速度增加 3 倍(Jaiswal,et al., 1991), NQO1 酵素活性增加 5 倍(Tang et al, 1996), 但這兩株皮膚細胞中處理 B[a]P 後, NQO1 基因表現並未增加, 可能是因為細胞種類不同之緣故。另外, 因為 NQO1 promoter 上有其他 responsive elements, 例如: 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate responsive element (TRE)及 antioxidant responsive element (ARE)(Wang, et al., 1996), 因此 TCDD 誘導 NQO1 基因表現可能還需要其他因子同時參予調控。



圖五. 比較 B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中誘導 CYPIA1、CYPIB1 及 NQO1 基因表現的能力

將 BCC 和 HaCaT 細胞株處理 1 或 10 μ M B[a]P 24 小時後，以半定量 RT-PCR 方式測定 CYPIA1、CYPIB1 及 NQO1 基因的表現。結果發現，B[a]P 誘導這兩株細胞 CYPIA1 基因表現的程度並不相同。在 HaCaT 細胞株中 B[a]P 誘導 CYPIA1 基因的表現和對照組比較約增加 8 倍；在 BCC 細胞株中之 B[a]P 誘導 CYPIA1 基因表現的程度則較低(約 1.5 倍)。另外在這兩株細胞中，B[a]P 誘導 CYPIB1 及 NQO1 基因表現的程度皆不高，但在對照組中 HaCaT 細胞株中 CYPIB1 基因表現程度比 BCC 細胞株高。

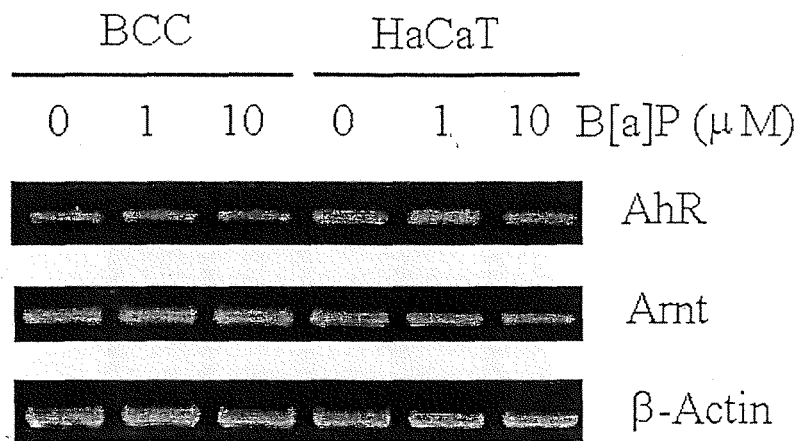
四、比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 基因表現之程度

已知 CYP1A1 基因表現是經由 AhR 與 Arnt 形成 heterodimer 複合物後，結合於 CYP1A1 基因上游的 DRE 而調控 CYP1A1 基因表現。已知 AhR 與 Arnt 基因表現程度因皮膚細胞分化程度不同而異(Wanner et. al., 1995)，而我們在圖一、二、三的結果顯示，BCC 與 HaCaT 細胞分化程度不同，因此我們進一步比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中，AhR 與 Arnt 基因表現程度是否不同，進而影響 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因的表現。

將 BCC 和 HaCaT 細胞株處理 1 或 10 μ M B[a]P 連續培養 24 小時後，以半定量 RT-PCR 方式測定 AhR 與 Arnt 基因的表現。 AhR 的 RT-PCR 產物大小為 183 bp，Arnt 的 RT-PCR 產物大小為 249 bp， β -actin 的 RT-PCR 產物大小為 541 bp。結果發現，BCC 和 HaCaT 細胞株皆有 AhR 與 Arnt 基因表現，且表現程度相似。而 BCC 細胞和 HaCaT 細胞株在處理 1 μ M、10 μ M B[a]P 24 小時後與處理溶劑對照組(DMSO)比較 AhR 與 Arnt 基因表現程度相似 (圖六.)。由此可知，在 BCC 和 HaCaT 細胞株中，AhR 與 Arnt 基因表現相似。

根據本實驗的結果，AhR 與 Arnt 基因雖然皆有表現，但仍必須

進一步檢測 AhR 與 Arnt 蛋白的表現。另外 Wanner 等人(1995)指出 AhR 基因在高分化的 HaCaT 細胞中(培養 14-21 天)表現程度比低分化程度的 HaCaT 細胞(培養 3 天)為高，而且人類上皮組織經原位雜交法分析顯示，AhR 與 Arnt 的 mRNA 在分化程度愈高的粒狀層和棘狀層表現程度愈高，在未分化的基底層則無法偵測到 AhR 與 Arnt mRNA 的表現(Wanner et. al.,1996)。因此，我們也進一步檢測這兩株分化程度不同的皮膚細胞，AhR 與 Arnt 蛋白的表現是否會有差異。



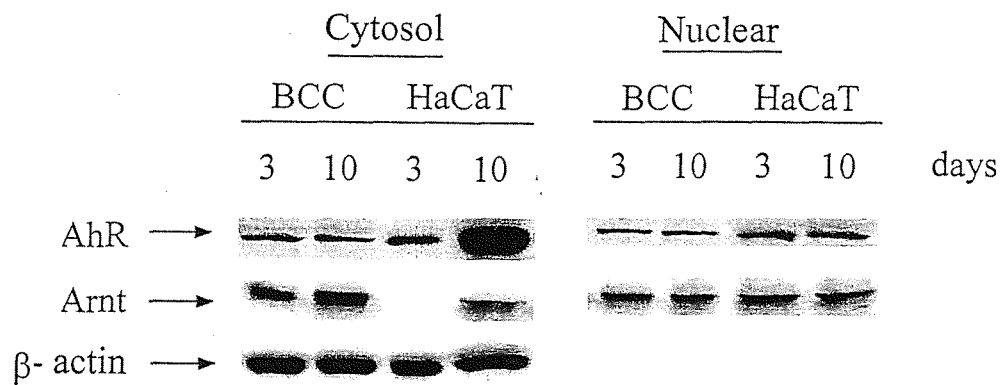
圖六. BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 基因表現之程度

將 BCC 和 HaCaT 細胞株處理 1 或 10 μ M B[a]P 24 小時後，以半定量 RT-PCR 方式測定 AhR 與 Arnt 基因的表現。結果發現，在這兩株細胞中皆有 AhR 與 Arnt 基因的表現，且表現程度相似，而且 B[a]P 並不會影響 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 基因的表現程度。

第五節、比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 蛋白表現之程度

由圖六我們雖然已知 BCC 和 HaCaT 細胞株中，AhR 與 Arnt 基因皆有表現，且不受 B[a]P 影響而改變其表現。但我們必須更進一步檢測在 BCC 和 HaCaT 細胞株中，AhR 與 Arnt 蛋白表現是否有所不同，導致影響 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因的表現。在經過細胞培養 3 天或 7 天後，利用西方墨點法來檢測 BCC 和 HaCaT 細胞株之細胞質與細胞核中 AhR 與 Arnt 蛋白的表現(AhR 與 Arnt 的分子量分別為 105 Kda 和 85 KDa)。結果發現，經過細胞培養 3 天後，在細胞質的部分：AhR 蛋白在這兩株細胞中皆有表現，而 Arnt 蛋白只在 BCC 細胞株之細胞質中有表現；在細胞核的部分：這兩株細胞中皆有 AhR 與 Arnt 蛋白的表現；經過細胞培養 7 天後，HaCaT 細胞的分化程度增加(由圖二.B. involucrin 表現增加可證實)，在細胞質的部分：HaCaT 細胞的 AhR 與 Arnt 蛋白的表現量也有明顯的增加，但 BCC 細胞並不表現分化指標 involucrin(圖二.B.)，且 AhR 與 Arnt 蛋白也沒有明顯的增加；在細胞核的部分：這兩株細胞皆有 AhR 與 Arnt 蛋白的表現，且表現量並沒有明顯的增加；而 β -Actin 蛋白在這兩株細胞中的表現量並沒有太大的差異。(圖七.)。由此可知，AhR 與 Arnt 蛋白表現隨著皮膚細胞分化程度增加而增加，但這兩株細胞中 AhR

與 Arnt 蛋白的表現程度與 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因表現之差異性並沒有直接的關係。Reiners 等人(1997)發現，將人類乳房表皮細胞轉殖 Ha-ras 基因後，會抑制 TCDD 誘導 CYP1A1 的表現，雖然 AhR 與 Arnt 蛋白的表現皆沒有改變，但 TCDD 活化 AhR 與 DNA 鍵結的能力卻受到影響，而抑制 CYP1A1 基因表現。因此，我們進一步檢測這兩株細胞中 B[a]P 活化 AhR 的能力是否有差異，而使兩株細胞的 CYP1A1 基因被誘導的程度不同。



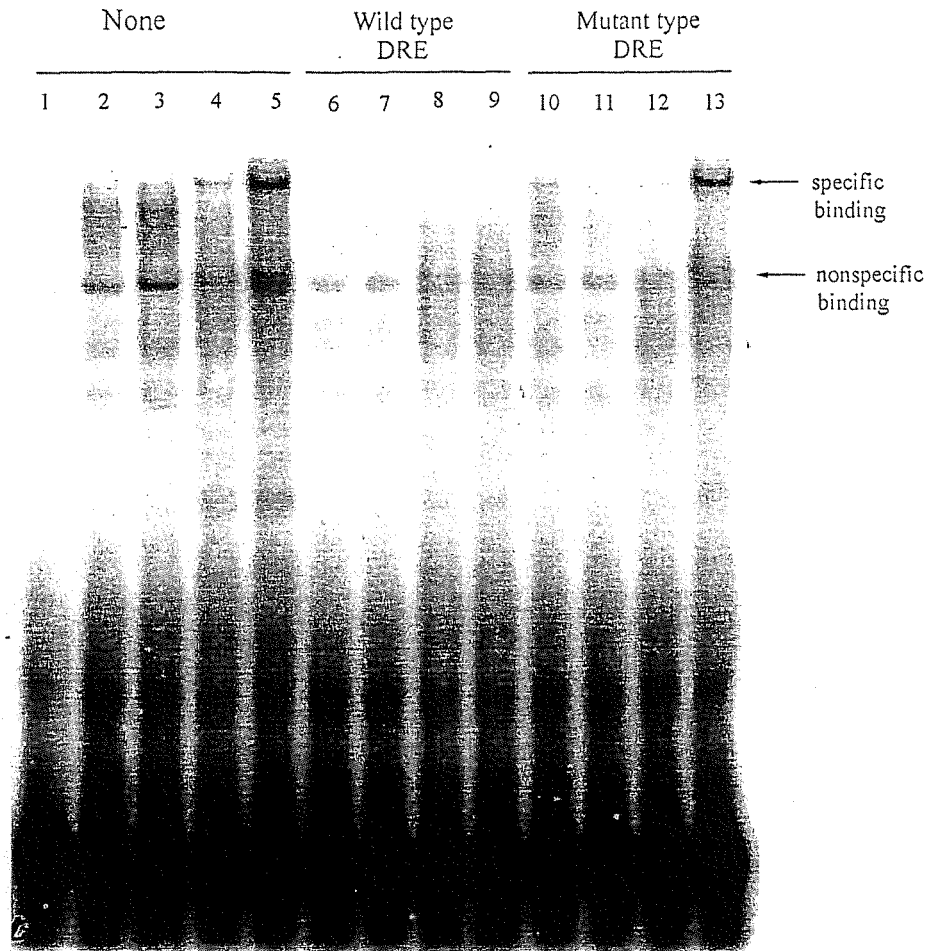
圖七. 比較 BCC 和 HaCaT 細胞株之細胞質與細胞核中 AhR 與 Arnt 蛋白的表現

細胞培養 3 天或 10 天後，利用西方墨點法檢測 BCC 和 HaCaT 細胞株之細胞質與細胞核中 AhR 與 Arnt 蛋白的表現程度。結果發現，培養 3 天後，在細胞質的部分：AhR 蛋白在這兩株細胞中皆有表現，且表現量並無差異，而 Arnt 蛋白只在 BCC 細胞株之細胞質中有表現；在細胞核的部分：在這兩株細胞中皆有 AhR 與 Arnt 蛋白的表現，但在 HaCaT 細胞株中 AhR 蛋白的表現量較多；經過 10 天培養後，在細胞質的部分：HaCaT 細胞株中，AhR 與 Arnt 蛋白的表現量有明顯的增加，但在 BCC 細胞株中並沒有明顯的增加；在細胞核的部分：在這兩株細胞中皆有 AhR 與 Arnt 蛋白的表現，且表現量並沒有明顯的增加。

第六節、B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中活化 AhR 的能力

接著欲瞭解 B[a]P 在 BCC 和 HaCaT 細胞株中活化 AhR 的能力是否有差異。由 Whitlock 等人(1996)研究指出，B[a]P 進入細胞後鍵結到 AhR 上，使原本鍵結在 AhR 上的 heat shock protein 90 (hsp90) 脫離，接著 AhR 轉移進入細胞核與 Arnt 鍵結形成 AhR-Arnt dimer 化合物，鍵結於 CYP1A1 基因 enhancer 上 DREs 的位置，促進 DRE 下游的 CYP1A1 等基因表現。因此 B[a]P 必須經由活化 AhR 才能誘導 CYP1A1 基因轉錄，而增加 CYP1A1 蛋白合成及酵素活性，所以我們接著以 Gel retardation assay 比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 被 B[a]P 活化之程度。首先將 BCC 和 HaCaT 兩株細胞種在 10 公分培養皿，待長至七、八分滿後加入 1 μ M B[a]P 繼續培養兩個小時，將細胞刮下，依照前述 Gel retardation assay 方法，偵測 AhR/Arnt 與 DRE 鍵結能力。結果發現 HaCaT 細胞株經 B[a]P 處理後，出現一明顯具有 32 P 放射性之 DRE-蛋白質複合體 (圖八.)。此複合體可被 100 倍濃度之非放射性 oligo(DRE)競爭而消失，但並不會被 100 倍濃度之非放射性 oligo(突變型 DRE)競爭而消失，顯示其為專一性之 DRE-蛋白質鍵結物應是 AhR-Arnt 與 DNA 之複合體。但是 BCC 細胞株中，在加入 B[a]P 之後，此複合體的強度並未增強 (圖八.)，

顯示 B[a]P 在 BCC 細胞株中無法增強 AhR/Arnt 與 DRE 之鍵結能力。
因此我們推測，BCC 細胞株中可能存在某種因子干擾 AhR/Arnt 與
DRE 之鍵結能力，也是導致這二株細胞對 B[a]P 之敏感性不同之原
因之一。



line 1 : control

line 3,7,11 : BCC, treated with 1 μ M BaP

line 5,9,13 : HaCaT,treated with 1 μ M BaP

line 10-13: compare with 100 x mutant type DRE

line 2,6,10 : BCC,treated with DMSO

line 4,8,12 : HaCaT,treated with DMSO

line 6-9 : compare with 100 x wild type DRE

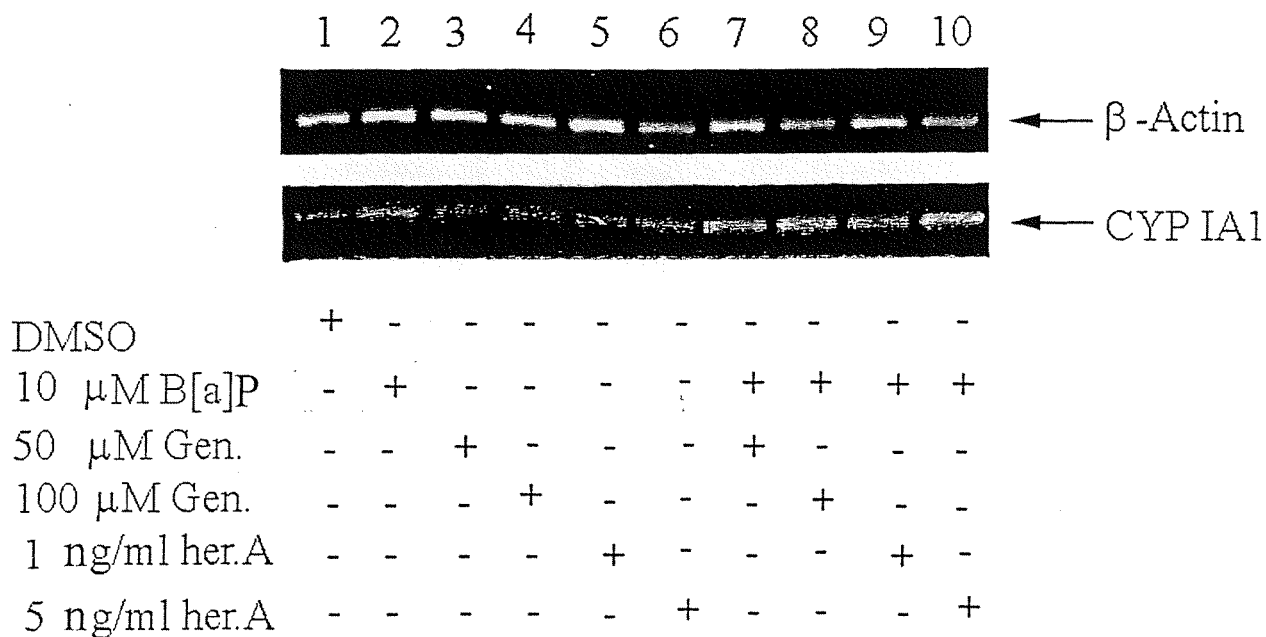
圖八. B[a]P 對 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 複合物與 DRE 鍵結能力的影響

將 BCC 和 HaCaT 細胞株處理 1 μ M B[a]P 2 小時後，以 gel retardation 方法檢測 BCC 和 HaCaT 細胞株中 B[a]P 所活化的 AhR 複合物與 DRE 鍵結能力的影響。結果發現， HaCaT 細胞處理 B[a]P 2 小時後，會增加 AhR 複合物與 DRE 鍵結的能力；而 BCC 細胞處理 B[a]P 2 小時後，並不會增加 AhR 複合物與 DRE 鍵結的能力。

第七節、探討 BCC 細胞株中是否某種 kinase 蛋白過度活化，以致影響 B[a]P 活化 AhR/Arnt 之作用

由前面實驗結果顯示，在 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 本身的表現並沒有太大的差異，而造成兩株細胞對 B[a]P 敏感性之差異，可能是 B[a]P 在 BCC 細胞株中無法增強 AhR 與 Arnt 之複合體與 DNA 鍵結，而導致 B[a]P 無法誘導 BCC 細胞株的 CYP1A1 的酵素活性。已知將 ras 基因轉殖至乳房表皮細胞，會降低 AhR/Arnt 被 TCDD 活化的程度，使 CYP1A1 基因無法被 TCDD 誘導(Reiners, et. al.,1997)，因此推論活化 ras 訊息傳遞路徑可能會干擾 AhR/Arnt 的活化。前人研究顯示，由化學致癌物所誘導的小鼠皮膚癌組織中，Ha-ras 發生突變的機率高達 90 % (Mills, et. al.,1992 ; Quintanilla, et. al.,1986)。已知 ras 會活化細胞內許多種 kinases，因此，我們假設 BCC 細胞株中存在某種 kinase 蛋白且過度活化，以致影響 B[a]P 活化 AhR/Arnt 之作用。 Genistein 是一種非專一性 tyrosine kinase 抑制劑(Wei, et. al.,1995)；Herbimycin A 也是一種 tyrosine kinase 抑制劑，主要抑制 PP60^{c-src} kinase (Kim, et. al., 1995)。將 BCC 細胞株連續培養 2 天後(約 8 分滿)，預先處理 tyrosine kinases 抑制劑---50 μ M 及 100 μ M Genistein 與 1ug/ml 及 5ug/ml Herbimycin A 15 分鐘，再加入 10 μ M B[a]P 繼續培養 24 小時後，以半定量 RT-PCR 方式測定 CYP1A1

基因的表現。結果發現，預先處理 tyrosine kinases 抑制劑（Genistein 與 Herbimycin A）能增強 B[a]P 誘導 BCC 細胞株 CYP1A1 基因的表現（與對照組比較分別增加 2.71 倍及 3.65 倍的表現量），且呈劑量反應的關係，表示在 BCC 細胞株中可能有某種 kinase 蛋白過度活化，而影響 B[a]P 所誘導之 CYP1A1 基因表現。將來，我們可進一步探討在 BCC 細胞中何種 tyrosine kinase 的活化影響 AhR/Arnt 的活化，而且此種 tyrosine kinase 的活化是否與細胞癌化現象有關。



圖九. 探討 BCC 細胞株中 tyrosine kinase 抑制劑對 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因表現之作用的影響

將 BCC 細胞株培養 2 天後(約 8 分滿), 預先處理 tyrosine kinase 抑制劑---50 μM 及 100 μM Genistein 或 1ug/ml 及 5ug/ml Herbimycin A 15 分鐘, 再加入 10 μM B[a]P 繼續培養 24 小時後, 以半定量 RT-PCR 方式測定 CYP1A1 基因的表現。結果發現, 在預先處理 tyrosine kinases 抑制劑(100 μM Genistein 或 5ug/ml Herbimycin A)後, B[a]P 會誘導 BCC 細胞株 CYP1A1 基因的表現(分別為 2.71 倍及 3.65 倍), 且有劑量反應的關係, 表示在 BCC 細胞株中可能有某種 kinase 蛋白過度活化, 而影響 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因表現之過程。

綜合以上的實驗結果我們可以發現，HaCaT 細胞株對 B[a]P 較為敏感，而 BCC 細胞株則對 B[a]P 呈現抗藥性之原因，主要可能是因為在 HaCaT 細胞株中 B[a]P 可以正常活化 AhR 進而誘導 CYP1A1 基因表現，CYP1A1 酵素進一步將 B[a]P 轉變成有毒的代謝物，而抑制細胞的生長；而 B[a]P 無法誘導 BCC 細胞的 CYP1A1 基因表現，導致 B[a]P 對 BCC 細胞株沒有毒性作用。 HaCaT 細胞是具有分化能力的正常皮膚細胞，AhR 與 Arnt 蛋白的表現會隨著細胞分化而增加。BCC 細胞為癌化、無分化能力的皮膚細胞，雖然 AhR 與 Arnt 蛋白都有表現，且分子量與 HaCaT 細胞相似，但是卻無法被活化，調控 CYP1A1 基因表現，本研究發現，BCC 細胞株中可能某種蛋白酶過度活化，而影響 AhR 與 Arnt 被 B[a]P 活化及誘導 CYP1A1 基因表現之能力。因此皮膚細胞癌化後，可能會喪失 AhR、Arnt 被活化的能力，BCC 細胞提供一個良好的細胞模式來探討細胞癌化與 AhR、Arnt 功能喪失的相關性。

另外，依據本實驗的結果，我們針對下列幾點加以討論：

(1). 在 BCC 細胞中那些 tyrosine kinase 可能干擾 AhR、Arnt 的活化？

在老鼠肝癌細胞中，TCDD 會活化 Src 的表現，而 Src 在細胞質中會與 AhR 形成複合物，使 AhR 無法進入細胞核，導致 TCDD 無法誘導 CYP1A1 基因的表現 (Blankenship, 1997)。

因此，BCC 細胞中可能是由於 Src 過度活化，導致 B[a]P 無法誘導 CYP1A1 基因的表現。

(2). 在 BCC 細胞中除了 tyrosine kinase 的干擾外，其他可能導致 B[a]P 無法誘導 CYP1A1 基因表現的原因：

a. benzo[a]pyrene uptake：

Yeh 等人 1992 年研究報告指出，具多種抗藥性的人類乳癌細胞可經由 P-glycoprotein (P-gp)，將 B[a]P 排出細胞外，減少 B[a]P 在細胞的囤積量，進而降低 B[a]P 對細胞的毒性。因此 BCC 細胞也可能具有 P-gp，將 B[a]P 排出細胞外，使 B[a]P 無法誘導 CYP1A1 基因的表現。

b. AhR/Arnt 突變：

已有研究報告指出，大鼠對 TCDD 的敏感性因品種而異，例如 Han/Wistar 品種大鼠對 TCDD 具抗藥性，最近發現這種大鼠肝臟細胞的 AhR 發生點突變，使 AhR 與 ligand 鍵結的親合力降低，導致 TCDD 無法誘導 CYP1A1 基因的表現 (Pohjanvirta et al., 1998)。另外，Numayama-Tsuruta 等人 1997 的研究指出，有些對 B[a]P 具抗藥性的小鼠肝癌細胞，例如 Hepa-1c1c7 細胞株，由於 Arnt 發生點突變，使 AhR 與 Arnt

無法形成 heterodimer，導致 TCDD 無法誘導 CYP1A1 基因的表現，而對 B[a]P 產生抗藥性。

c. Negative regulatory element：

Walsh 等人 1996 的研究指出，在大鼠上皮細胞中，CYP1A1 基因 promoter 前有一段 negative regulatory element，它會抑制 TCDD 誘導 CYP1A1 基因的表現。但由其 gel shift 的實驗結果中發現，negative regulatory element 並不會影響活化的 AhR 與 DRE 的鍵結。因此，推測 BCC 細胞株中，negative regulatory element 影響的程度並不大。

d. Repressor：

Mimura 等人在 1999 年研究指出，在老鼠小腸中發現一個結構類似 AhR 的基因，稱之為 Ah receptor repressor (AhRR)，在老鼠肝細胞中若長期處理 TCDD、3MC 會誘導 CYP1A1、GST-Ya、AhRR 基因的表現，而 AhRR 會進行負調控，進入細胞核中與 Arnt 鍵結，導致 AhR、Arnt 無法形成 heterodimer，進而影響 TCDD 誘導 CYP1A1 基因的表現。另外 Gradin (1993) 等人的研究指出，在人類纖維母細胞中，有兩個 constitutive protein (XF1、XF2)，會與 AhR 競爭和 DNA

binding 的位置，而降低 TCDD 誘導 CYP1A1 的基因表現。

e. 其他 transcription factor 與 AhR/Arnt interaction 干擾其活化：

Tian 等人在 1999 年研究指出，AhR 與 NF-kappaB 之間會有 interaction，兩者之間會相互抑制其功能，而 BCC 細胞中可能由於 AhR 與 NF-kappaB 之間有 interaction，導致 AhR 功能異常，使 B[a]P 無法誘導 CYP1A1 基因的表現。

(3). AhR/Arnt與皮膚分化或癌化的關係：

a. AhR/Arnt與皮膚分化的關係：

Wanner(1996)等人指出 AhR/Arnt mRNA 會隨著細胞分化程度愈高其表現量愈多，與本研究結果相似，且印證在蛋白的表現亦是如此。但 Wanner(1996)等人也指出，在基底表皮細胞中測不到 AhR/Arnt RNA 的表現，而在 BCC 細胞中 AhR/Arnt 卻皆有表現。這可能是因為，BCC 雖屬癌化細胞且測不到晚期分化指標(involucrin)的表現，但仍測到的到早期分化指標(K1-K10)的表現，這表示 AhR 可能在細胞分化初期即會有表現。

b. AhR/Arnt與皮膚癌化的關係：

Reiner(1997)等人的研究指出癌化細胞中，PAHs 經由

AhR/Arnt 誘導 CYP1A1 表現的程度會降低，與本研究結果其相似，而 Reiner(1998)等人也指出小鼠皮膚癌化組織中 AhR/Arnt mRNA 的表現較低(約 20%)，但 BCC 細胞中 AhR/Arnt 的表現並沒有因細胞癌化而改變，這除了細胞種類不同的緣故之外，mRNA 的表現量降低，並不能代表蛋白的表現量也會降低。因此 Reiner 等人的研究結果無法直接證實在癌化組織中 AhR 與 Arnt 蛋白表現量降低。

第五章、参考文献

- Agnes, A. W., Tullis, K., Rice, R. H. and Denison, M. S. (1996) Identification of a novel cis-acting negative regulatory element affecting expression of the CYP1A1 gene in rat epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 271, 22746-22753.
- Aix, L., Grobelle, X. R., Larrieu, G., Lesca, P. and Galtier, P. (1994) Thiabendazole in inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1483-1489.
- Ayoub, P. and Shklar, G. (1963). A modification of the Mallory connective tissue stain as a stain for keratin. *J. Oral. Surg.* 16, 580-581.
- Baars, A. J., Jansen, M. and Breimer, D. D. (1978) The influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on glutathione S-transferase activity of rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 27, 2487-2494.
- 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. *Toxicol. Lett.* 10, 109-118.
- Bjoreth, A. and Ramdahl, T. (1985) *In Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbon : emission sources and recent progress in analytical chemistry.* Bjoreth, A. and Ramdahl, T.(eds) Marcel Dekker, New York, 1-20.
- Blankenship, A. and Matsumura, F. (1997) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol. Pharmacol.* 52, 667-675.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye

- binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brookes, P. and Lawley, P. D. (1964) Methylation of adenine in deoxyadenylic acid or deoxyribonucleic acid at N-7. *Biochem. J.* 92, 19C-20C.
- Buckley, T. J. and Lioy, P. J. (1992) An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br. J. Ind. Med.* 49, 113-117.
- Castro, V. M., Soderstrom, M., Carlberg, I., Widersten, M., Platz, A. and Mannervik, B. (1990) Difference among human tumor cell lines in expression of glutathione transferases and other glutathione-linked enzymes. *Carcinogen.* 11, 1569-1576.
- 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. *Pharmacol. Ther.* 55, 183-190.
- Chen, J. Q., Strom, A., Gustafsson, J. A. and Morgen, E. T. (1995) Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol. Pharmacol.* 47, 940-947.
- Cherpillod, P. and Amstad, P. A. (1995) Benzo[a]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Mol. Carcinogen.* 13, 15-20.
- Chuang, J. C., Wise, S. A., Cao, S. and Mumford, J. L. (1992) Chemical characterization of mutagenic fractions of particles from indoor coal combustion: a study of lung cancer Xuan Wei, China. *Environ. Sci. Technol.* 26, 999-1004.
- Corton, J. C. (1996) Overlapping but unique DNA binding specificities of the Ah receptor and constitutive dioxin-responsive element binding proteins from human keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 85, 67-75.

- Cuthill, S., Wilhelmsson, A. and Poellinger, L. (1991) Role of the ligand in intracellular receptor function: receptor affinity determines activation in vitro of the latent dioxin receptor to a DNA-binding form. *Mol. Cell. Biol.* 11, 401-411.
- Dannan, G. A., Guengerich, F. P., Kaminsky, L. S. and Aust, S. D. (1983) Regulation of cytochrome P-450. Immunochemical quantitation of eight isozymes in liver microsomes of rats treated with polybrominated biphenyl congeners. *J. Biol. Chem.* 258, 1382-1288.
- Denison, M. S. and Yao, E. F. (1991) Characterization of the interaction of transformed rat hepatic cytosolic Ah receptor with a dioxin responsive transcriptional enhancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 158-166.
- 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. *J. Biol. Chem.* 263, 17221-17224.
- Denison, M. S., Vella, L. M. and Okey, A. B. (1986) Structure and function of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Species difference in molecular properties of the receptors from mouse and rat hepatic cytosols. *J. Biol. Chem.* 261, 3987-3995.
- Dipple, A., Cheng, S. C. and Bigger, C. A. H. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens, In aeschbacher HU and Sato S (eds) : "Mutagens and Carinogens in the diet." New york, Toronto, Singapore : Wiley-Liss Press, 109-127.
- Dipple, A., Pigott, M. A., Agarwal, S. K., Yagi, H., Sayer, J. M. and Jerina, D. M. (1987) Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature.* 327, 535-536.
- Dunn, B. P. and Stich, H. F. (1986) ³²P-postlabeling analysis of aromatic DNA adducts in human oral mucosal cells. *Carcinogen.* 11, 11-15.
- Everson, R. B., Randerath, E., Santella, R. M., Cefalo, R. C., Avitts, T. A. and Randerath, K. (1986) Detection of smoking-related covalent DNA adducts in human placenta. *Science* 231, 54-57.

- Fernandez, S. P., Pineau T, Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S. T., Kimura S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J., (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding ah receptor. *Science* 268 , 722-726.
- 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. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 140, 173-179.
- Franzen, B., Haaparanta, T., Gustafsson, J. A., Toftgard, R. (1988) TCDD receptor ligands present in extracts of urban air particulate matter induce aryl hydrocarbon hydroxylase activity and cytochrome P-450c gene expression in rat hepatoma cells. *Carcinogen.* 9, 111-115.
- Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation : The Bare Essentials. *J. Cell Biol.* 111, 2807-2814.
- Fukunaga, B. N., Markus Probst, R., Porszasz, S. R. and Hankinson, O. (1995) Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29270-29278.
- Gaido, K. W., Maness, S. C., Leonard, L. S. and Greenlee, W. F. (1992) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of transforming growth factors- α and $-\beta$ 2 expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and post-transcriptional control. *J. Biol. Chem.* 267, 34, 24591-24595.
- Gaido, K.W., Maness, S.C., Leonard, L.S. and Greenlee, W. F. (1 992) 2,3 ,7,8 -Tetrachlorodi hen zo-p -di oxi n-dependent regulation of transforming growth factors-x and 13, expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and post-transcriptional control. *J. Biol. Chem.* 267, 24591-24595.
- Ge, N. L. and Elferink, C. J. (1998) A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* 273(35), 22708-22713.
- Giannone, J. V., Li, W., Probst, M., and Okey, A. B.(1998) Prolonged

depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* 55 , 489-497.

Gradin, K., Wilhelmsson, A., Poellinger, L. and Berghard, A. (1993) Nonresponsiveness of normal human fibroblasts to dioxin correlates with the presence of a constitutive xenobiotic response element-binding factor. *J Biol Chem.* 268(6), 4061-4068.

Guengerich, F. P., Dannan, G. A., Wright, S. T., Martin, M. V. and Kaminsky, K. S. (1982) Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or 8-naphthoflavone. *Biochem.* 21, 6019-6030.

Gupta, R. C. and Earley, K. (1988) ³²P-adduct assay : comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedure. *Carcinogen.* 9, 1687-1693.

Guzelian, P. S., Li, D., Schuetz, E. G., Thomas, P., Levin, W., Mode, A. and Gustafsson, J.-A. (1988) Sex change in cytochrome P-450 phenotype by growth hormone treatment of adult rat hepatocytes maintained in a culturesystem on matrigel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9783-9787.

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. *Carcinogen.* 18(2), 391-397.

Harris, C. C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. Suppl.* 51, 5023s-5044s.

Hazardous Substances Data Bank. (1988) National Library of Medicine. National Toxicology Program, Bethesda, MD. December 5.

Higginbotham, S., RamaKrishna, N. V. S., Johansson, S. L., Rogan, E. G. and Cavalieri, E. L. (1993) Tumor-initiating activity and carcinogenicity

- of dibenzo[*a,l*]pyrene versus 7, 12-dimethylbenzo[*a*]anthracene and benzo[*a*]pyrene at low doses in mouse skin. *Carcinogen*. 14, 875-878.
- Hoffer, A., Chang, C.-Y. and Puga, A. (1996) Dioxin induces transcription of *fos* and *jun* gene by Ah receptor-dependent and-independent pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 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.
- Hossain, A., Tsuchiya, S., Masayoshi, Osada, M., Ikawa, S., Tezuka, F., Kaji, M., Konno, T., Watanabe, M. and Kikuchi, H. (1998) The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines. *J. Biol. Chem.* 273, 19853-19858.
- Houser, W., Hines, R. and Bresnick, E. (1985) Implication of the '4S' polycyclic aromatic binding protein in the transregulation of rat cytochrome P-450e expression. *Biochem.* 24, 7839-7845.
- Hughes, N. C. and Phillips, D. H. (1993) ³²p-postlabeling analysis of the covalent binding of benzo[*g,h, i*]perylene to DNA in vivo and in vitro. *Carcinogen*. 14, 127-133.
- Hughes, N. C., Pfau, W., Hewer, A., Jacob, J., Grimmer, G. and Phillips, D. H. (1993) Covalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbon components of coal tar to DNA in mouse skin. *Carcinogen*. 14, 135-144.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Lyon: World Health Organization, 1997
- 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. *J. Biol. Chem.* 259, 5400-

- Jaiswal, A. K. (1991) Human NAO(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. *Biochem.* 30, 10647-10653.
- 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. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 5714-5715.
- Jones, E. J. and Riddick, D. S. (1996) Regulation of constitutive rat hepatic cytochromes P450 by 3-methylcholanthrene. *Xenobiotica* 26, 995-1012.
- Kharat, I. and Saatcioglu, F. (1996) Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 271(18), 10533-10537.
- Kim, B. Y., Ahn, S. C., Oh, H. K., Lee, H. S., Mheen, T. I., Rho, H. M. and Ahn, J. S. (1995) Inhibition of PDGF-induced phospholipase D but not phospholipase C activation by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(3), 1061-1067.
- Kiyohara, C., Hirohata, T. and Inutsuka, S. (1996) The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene. *Jpn. J. Cancer Res.* 87(1), 18-24.
- Kocarek, T. A., Schuetz, E. G. and Guzelian, P. S. (1993) Expression of multiple forms of cytochrome P450 messenger RNAs in primary cultures of rat hepatocytes maintained on matrigel. *Mol. Pharmacol.* 43, 328-334.
- Koch, K. S., Fletcher, R. G., Grond, M. P., Inyang, A. I., Lu, X. P., Brenner, D. A., Leffert, H. L. (1993) Inactivation of plasmid reporter gene expression by one benzo(a)pyrene diol-epoxide DNA adduct in adult rat hepatocytes. *Cancer Res.* 53(10 Suppl), 2279-2286.

- Hoffer, A., Chang, C.Y. and Puga, A. (1996) Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141(1), 238-247.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LeBlanc, G. A. and Waxman, D. J. (1988) Feminization of rat hepatic P-450 expression by cisplatin. Evidence for perturbations in the hormonal regulation of steroid-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 263, 15 733-15 739.
- 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. *Mutat. Res.* 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. *Environ. Mol. Mutagen.* 23, 200-207.
- Lee, S. J., Friedman, S. L., Whalen, R. and Boyer, T. D. (1994) Cellular sources of glutathione S-transferase P in primary cultured rat hepatocytes: Localization by in situ hybridization. *Biochem. J.* 299, 79-83.
- Legraverend, C., Mode, A., Westin, S., Strom, A., Eguchi, H., Zaphiropoulos, P. G. and Gustafsson, J. A. (1992) Transcriptional regulation of rat P-450 2C gene subfamily members by the sexually dimorphic pattern of growth hormone secretion. *Mol. Endocrinol.* 6, 259-266.
- Li, S. G., Pan, D. H. and Wang, G. X. (1994) analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch. Environ. Health*, 49, 119-122.
- Liddle, C., Mode, A., Legraverend, C. and Gustafsson, J.-A. (1992) Constitutive expression and hormonal regulation of male sexually differentiated cytochromes-P450 in primary cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 159-166.

- Lin, F.H., Clark, G., Birnbaum, L.S., Lucier, G.W. and Goldstein, J.A. Influence of the Ah locus on the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p -dioxin on the hepatic epidermal growth factor receptor. *Mol. Pharmacol.* 39, 307-313.
- Lin, F. H., Stohs, S. J., Birnbaum, L. S., Clark, G., Lucier, G. W. and Goldstein, J. A. (1991) The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p -dioxin (TCDD) on the hepatic estrogen and glucocorticoid receptors in congenic strains of Ah responsive and Ah nonresponsive C57BL/6J mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108, 129-139.
- Lindahl, R. (1992) Aldehydehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 283-335.
- Lindros, K. O., Oinonen, T., Kettunen, E., Sippel, H., Concha, M. L. and Koivusalo, M. (1998) Aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 55, 413-421.
- Lioy, P. L. and Greenberg, G. (1990) Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Ind. Health*, 6, 209-215.
- 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: comparison of the inhalation and food pathways. *Arch. Environ. Health.* 43, 304-312.
- Manchester, D. K., Weston, A., Choi, J. S., Trivers, G. E., Fennessy, P. V., Quintana, E., Farmer, P. B., Mann, D. L. and Harris, C. C. (1988) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9243-9247.
- Martins, E. A. L., Chubatsu, L. S. and Meneghini, R. (1991) Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. *Mutation Res.* 250, 95-101.
- McCance, D. J., Kopan, R., Fuchs, E. and Laimins, L. (1988) Human Papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 7169-7173.

- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72, 5135-5139.
- Merchant, M., Krishnan, V. and Safe, S. (1993) Mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120(2), 179-185.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayedi, S. and Kevekordes, S. (1992) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in Escherichia coil PQ37. *Mutat. Res.* 278, 1-9.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah(dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13(1), 20-25.
- Mills, K. J., Bocckino, S. B., Burns, D. J., Lommis, C. R. and Smart, R. C. (1992) Alterations in protein kinase C isozymes α and β 2 in activated Ha-ras containing papillomas in the absence of an increase in diacylglycerol. *Carcinogen.* 13, 1113-1120.
- Moscow, J. A., Fairchild, C. R., Madden, M. J., Ransorm, D. T., Wieand, H. S., O'Brien, E. E. Poplack, D. G., Cossman, J., Myers, C. E. and Cowan, K. H. (1989) Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res.* 49, 1422-1428.
- Moses, M. and Prioleau, P. G. (1985) Cutaneous histologic findings in chemical workers with and without chloracne with past exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 12, 497-506.
- Mumford, J. L., Li, X., Hu, F., Lu, X. B. and Chuang, J. C. (1995) Human exposure and dosimetry of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine Xuan Wei, China with high lung cancer mortality associated with exposure to unvented coal smoke. *Carcinogen.* 16, 3031-3036.
- Mumford, J. L., He, X. Z., Chapman, R. S., Cao, S. R., Harris, D. B., Li, X. M., Xian, Y. L., Jiang, W. Z., Xu, C. W., Chuang, J. C, Wilson, W. E.

- and Cooke, M. (1987) Lung cancer and indoor air pollution in Xuan Wei, China. *Science* 235, 217-220.
- 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. *J Biol Chem.* 269 (18), 13656-13662.
- Numayama-Tsuruta, K., Kobayashi, A., Sogawa, K. and Fujh-Kuriyama, Y. (1997) A point mutation responsible for defective function of the aryl-hydrocarbon-receptor nuclear translocator in mutant Hepa-1c1c7 cells. *Eur. J. biochem.* 246, 486-495.
- Okey, A. B. and Vella, L. M. (1982) Binding of 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to a common Ah receptor site in mouse and rat hepatic cytosols. *Eur. J. Biochem.* 127, 39-47.
- 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. *J. Biol. Chem.* 255, 11415-11422.
- Okey, A. B., Riddick, D. S. and Harper, P. A. (1994) Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 226-232.
- Pahlman, R. and Pelkonen, O. (1987) Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogen.* 8, 773-778.
- Paine, A. J. (1990) The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system. *Chem. Biol. Interact.* 74, 1-31.
- Paramio, J. M., Lain, S., Segrelles, C., Lane, E. B. and Joreano, J. L. (1998) Differential expression and functionally co-operative roles for the

retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 17, 949-957.

Perdew, G. H. (1992) Chemical cross-linking of the cyto-solic and nuclear forms of the Ah receptor in hepatoma cell line lclc7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 55-62.

Phillips, D. H., Hewer, A., Martin, C. N., Garner, R. C. and King, M. M. (1988). Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature* 336 , 790-792.

Phillips, D. H., schoket, B., Hewer, A., Bailey, E., Kostic, S. and Vincze, I. (1990a) Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer*, 46, 569.

Phillips, H. D., Hewer, A., Malcolm, A. D. B., Ward, P. and Coleman, D. V. (1990b) Smoking and DNA damage in cervical cells. *Lancet* 335, 417-421.

Piskorska-Pliszczynska, J., Keys, B., Safe, S. and Newman, M. S. (1986) The cytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* 34, 67-73.

Pedro-Botet, J., Superv, A., Barranco, C., Sol, R. and Bruguera, M. (1996) Intrahepatic cholestasis without hepatitis induced by amoxicillin/clavulanic acid. *J. Clin. Gastroenterol.* 23(2), 137-138.

Pohjanvirta, R., Wong, J. M. Y., Li, W., Harper, P. A., Tuomisto, J. and Okey, A. B. Point Mutation in intron sequence causes altered carboxyl-terminal structure in the aryl hydrocarbon receptor of the most 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-resistant rat strain. *Mol Pharmacol.* 54(1), 86-93.

Pollent, R. S., Sattler, C.A. and Poland, A. (1994) The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor calizations in Hepa-lclc7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol. Pharmacol.* 45, 428-438.

- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. and Balmain, A. (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322, 78-80.
- Reiners, J. J., Jr., Jones, C. L., Hong, N., Clift, R. E. and Elferink, C. (1997) Downregulation of aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 IA1 induction by expression of Ha-ras oncogenes. *Mol. Carcinogen.* 19, 91-100.
- Reiners, J. J., Jr., Lee, J.-Y., Clift, R. E., Dudley, D. T. and Myrand, S. P. (1997) PD98059 Is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol. Pharmacol.* 53, 438-445.
- Reiners, Jr. J. J., Jones, C. L., Hong, N. and Myrand, S. P. (1998) Differential induction of cyp1a1, cyp1b1, ahd4, and nmol1 in murine skin tumors and adjacent normal epidermis by ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Carcinogen.* 21, 135-146.
- Richard, A. M. and Woo, Y. T. (1990) A CASE-SAR analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenicity. *Mutat. Res.* 242, 285-303.
- Richter, C., Park, J. W. and Ames, B. N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Sec. Acad. Sci. USA*, 85, 6465-6467.
- Riddick, D. S., Huang, Y., Harper, P. A. and Okey, A. B. (1944) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene. Comparative studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1. *J. Biol. Chem.* 269, 12118-12128.
- Roggeband, R., Wolterbeek, A. P., Melis, O. W. M. Wittekoek, M. E., Rutten, A. A., Feron, V. J. and Baan, R. A. (1994) DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogen.* 15, 661-665.
- 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. *Carcinogen*. 14, 1945-1950.
- Romert, L., Dock, J., Janssen, D. and Jernstrom, B. (1989) Effects of glutathione transferase activity on benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol metabolism and mutagenesis studied in a mammalian cell co-cultivation assay. *Carcinogen*. 10, 1701-1707.
- Roop, D.R., Huitfeldt, H., Kilkenny, A. and Yuspa, S. H. (1987) Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured epidermal cells detected by monospecific antibodies to unique peptides of mouse epidermal keratins. *Differentiation*. 35(2), 143-150.
- 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. *Carcinogen*. 11, 1241-1246.
- Safe, S. H. (1986) Comparative toxicology and mechanism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 371-399.
- Sakai, M., Yoshida, D. and Mizusaki, S. (1985) Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat. Res.* 156, 61-67.
- Santostefano, M., Piskorska-Pliszczyńska, J., Morrison, V. and Safe, S. (1992) Effects of ligand structure on the in vitro transformation of the rat cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 71-79.
- Savas, U. and Jefcoate, C. R. (1994) Dual regulation of cytochrome P450EF expression via the aryl hydrocarbon receptor and protein stabilization in c3H/10T1/2 cells. *Mol. Pharmacol.* 45(6), 1153-1159.
- Schoket, B., Horkay, I., Kosa, A., Paldeak, L., Hower, A., Grover, P. L. and Phillips, D. H. (1990) Formation of DNA adducts in the skin of psoriasis patients, in human skin in organ culture, and in mouse skin

- and lung following topical application of coal-tar and juniper tar. *J. Invest. Dermatol.* 94, 241-246.
- Schooten, F. J., Hillebrand, M. J., van Leeuwen, F. E., Lutgerink, J. T., van Zandwijk, N., Jansen, H. M. and Kriek, E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients, *Carcinogen.* 11, 1677-1681.
- Seidman, L. A., Moore, C. J. and Could, M. N. (1988) ³²P-postlabeling analysis of DNA adducts in human and rat mammary epithelial cells *Carcinogen.* 9, 1071-1076.
- Shimada, M., Murayama, N., Yamauchi, K., Yamazoe, Y. and Kato, R. (1989) Suppression in the expression of a male-specific cytochrome P450, P450-male: difference in the effect of chemical inducers on P450-male mRNA and protein in rat livers. *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 578-587.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P. and Sutter, T. R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 IB1. *Cancer Res.* 56(13), 2979-2984.
- Strom, A., Eguchi, H., Mode, A., Legraverend, C., Toilet, P., Stromstedt, P. E. and Gustafsson, J. A. (1994) Characterization of the proximal promoter and two silencer elements in the CYP2C II gene expressed in rat liver. *DNA Cell Biol.* 13, 805-819.
- Suskind, R. R. (1985) Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication". *Scand. J. Work Environ. Health.* 11, 165-171.
- 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(47), 12841-12849.
- Swedmark, S., Romert, L., Morgenstern, R. and Jenssen, D. (1992) Studies on glutathione transferases belonging to class pi in cell lines with different capabilities for conjugating (+)-7β,8α-dihydroxy-9 α,10 α -

- oxy-7,8,9,10-tetra-hydrobenzo[a]-pyrene. *Carcinogen.* 13, 1719-1723.
- Tang, Y. M., Wo, Y. Y. P., Stewart, J., Hawkin, A. L., Griffin, C. A., Sutter, T. R. and Greenlee, W. F. (1996) Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* 271(45), 28324-28330.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M. S. Rabson, A. B. and Gallo, M. A. (1999) Ah receptor and NF-kappaB interaction, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* 274(1), 510-515.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Tsui, H. W. and Okey, A. B. (1981) Rapid vertical tube rotor gradient assay for binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to the Ah receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59, 927-931.
- van Schooten, F. J., Hillebrand, M. J., van Leewen, F. E., Lutgerink, J. T., van Zandwijk, N., Jansen, H. M. and Kriek, E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogen.* 11, 1677-1681.
- Vanden Heuvel, J. P. and Lucier, G. (1993) Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ. Health Perspect.* 100,189-200.
- 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. *Carcinogen.* 6, 749-752.
- Walsh, A. A., Tullis, K., Rice, R. H. and Denison, M. S. (1996) Identification of a novel cis-acting negative regulatory element affecting expression of the CYP1A1 gene in rat epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 271(37), 22746-22753.

- Wang, B. and Williamson, G. (1996) Transcriptional regulation of the human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene by monofunctional inducers. *Biochim Biophys Acta.* 1307(1), 104-110.
- Wanner, R., Brommer, S., Czarnetzki, B. M. and Rosenbach, T. (1995) The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 706-711.
- Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. M. and Rosenbach, T. (1996) Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317(2), 105-111.
- Wanner, R., Zhang, J., Henz, B. M. and Rosenbach, T. (1996) AP-2 gene expression and modulation by retinoic acid during keratinocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 666-669.
- Waxman, D. J. and Chang, T. K. H. (1995) Hormonal regulation of liver cytochrome P450 enzymes. In: P.R. Ortiz de Montellano (Ed.) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 2nd edition. Plenum Press, New York, pp. 391-417.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. and Wang, Y. (1995) Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 208(1), 124-130.
- 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 J.* 10(8), 809-818.
- 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. *Carcinogen.* 14, 463-467.

- Wood, S. M., Gleadle, J. M., Pugh, C. W., Hankinson, O. and Ratcliffe, P. J. (1996) The Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 15117-15123.
- Yeh, G. C., Lopaczynska, J., Poore, C. M. and Phang, J. M. (1992) A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo(alpha)pyrene in human breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res.* 52(230), 6692-6695.
- Yeowell, H. N., Waxman, D. J., LeBlanc, G. A., Linko, P. and Goldstein, J. A. (1989) Suppression of male-specific cytochrome P450 2c and its mRNA by 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl in rat liver is not causally related to changes in serum testosterone. *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 508-514.
- Yeowell, H. N., Waxman, D. J., Wadhera, A. and Goldstein, J. A. (1987) Suppression of the constitutive, male-specific rat hepatic cytochrome P-450 2c and its mRNA by 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* 32, 340-347.
- Yoshihara, S., Nagata, K., Wada, I., Yoshimura, H., Kuroki, H. and Masuda, Y. (1982) A unique change of steroid metabolism in rat liver microsomes induced with highly toxic polychlorinated biphenyl (PCB) and polychlorinated dibenzofuran (PCDF). *J. Pharm. Dyn.* 5, 994-1004.