

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討肺癌麩胱甘肽轉移酶-M2 基因表現與肺部發炎之調控 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2311-B-040-003-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：柯俊良

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：廖建皇
碩士班研究生-兼任助理：黃嘉瑩、高德佑、詹琇雯

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96年10月25日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

探討肺癌麩胱甘肽轉移酶-M2 基因表現與肺部發炎之調控

Modulate the inflammation of lung and expression of GST-Mu2 in lung carcinomas

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：95-2311-B-040-003-

執行期間：95年8月1日至96年7月31日

計畫主持人：柯俊良

共同主持人：

計畫參與人員：廖建皇 吳松鎔 翁甄憶 胡哲榮

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 96 年 10 月 25 日

附件二

可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱：探討肺癌麩胱甘肽轉移酶-M2 基因表現與肺部發炎之調控 計畫主持人：柯俊良 計畫編號：NSC 95-2311-B-040-003- 學門領域：生物生化
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：

可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

- ※ 1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討肺癌麩胱甘肽轉移酶-M2 基因表現與肺部發炎之調控

Modulate the inflammation of lung and expression of GST-Mu2 in lung carcinomas

計畫編號：NSC 95-2311-B-040-003-

執行期限：95 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：柯俊良

中山醫學大學 醫學分子毒理所

中文摘要：

麩胱甘肽轉移酶 (GST)在細胞特有的解毒機制中扮演重要的角色，它可移除來自細胞外的毒性物質並減少毒性物質對細胞的傷害。但同時也扮演著化療藥物的抗性機制。先前的研究對於細胞如何移除 BPDE 所造成的 DNA 傷害，主要是以 GST-P1 與 GST-A1 為主；因為前者主要大量表現於肺部，而後者大量表現於肝臟。而這兩個器官都是容易接觸到毒性物質的部位，因此 GST-P1 與 GST-A1 的功能也就被大家所廣泛的研究探討。GST-M2 一般的研究都指出可大量表現於腦部與睪丸中，事實上在肺部的組織中亦有發現 GST-M2 的表現，只是表現量不如 GST-P1 強，因此也就鮮少被研究其在肺部所扮演的角色，然而之前所採用的偵測方式多為免疫組織染色方法，GST 此類 isoforms 序列又相當類似，所以產生的抗體極有可能具有交互作用。本研究使用專一性的 GST primer 分析，確定肺部組織中確有 GST-M2 表現，且第一個提出在肺細胞中表現的 GST-M2 且可有效的降低 BPDE 所造成的 DNA 傷害，而相較於同屬 GST-Mu 家族的 GST-M4 則沒有類似的功能，雖然兩著的序列相似性達 83%；推測可能是兩者之間的受質結合部位不同所造成。又意外的發現在腫瘤及肺癌細胞中 GST-M2 表現較正

常肺細胞及非肺癌組織中相對的低。因此，本研究首先欲探討腫瘤及肺癌細胞 GST-M2 表現量降低的原因與其 promoter 的甲基化有無關係，或受何因子調控影響其 Promoter 上的 response element 的結合致使腫瘤細胞 GST-M2 基因不表達。本研究以 RT-PCR 與 Real-time PCR 分析正常肺細胞株(MRC-5、WI-38 與 Beas-2B)與肺癌細胞株(H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、CL 1-0 與 CL 1-5)中 GST M2 mRNA 的表現。結果顯示，肺癌細胞株的 GST M2 基因表現量比正常肺細胞株低。此外，GST M2 基因並非因 genomic DNA 缺失而造成在肺癌細胞株中 GST M2 基因表現降低。將 H1355 細胞分別或共同處理(1)histone deacetylase(HDAC)inhibitor : TSA 及 demethylation agent : 5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)，皆無法回復 GST M2 基因的表現。因此，推測 H1355 細胞株中 GST M2 的不表現，並非因為啟動子的 CpG 發生甲基化或組織蛋白去乙酰化所造成。因此 H1355 肺癌細胞株中 GST M2 表現量降低的機轉，仍待進一步釐清另外也發現 GST M2 降低 H1355 細胞株經 B[a]P 處理後所造成細胞週期之 S 與 G2/M phase 堆積。然而麩胱甘肽轉移酶-M2 的酵素活性仍未證實有效的移除 BPDE 造成的 DNA 傷害及發炎反應。綜言之，肺癌的成

因與預後不佳可能與 GST M2 的喪失有關。綜合以上結果，本研究證實穩定表現 GST-M2 於 H1355 肺癌細胞株可有效的降低經由 B(a)P 所造成的傷害，同時也說明了 GST-M2 酵素活性對於降低 B(a)P 造成之傷害可能扮演重要的角色。

Key words: 麩胱甘肽轉移酶，發炎，肺癌
英文摘要

Glutathione S transferases(GSTs)are a family of phase II detoxification enzymes that catalyse the conjugation of glutathione(GSH)to a wide variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds. In our previous studies, we found that the overexpression of GST M2 gene in H1355 cells prevented BPDE-mediated formation of DNA adducts. Furthermore, by using RT PCR and Real time-PCR, we found that the expression level of GST M2 was lower in lung cancer cells in comparison to normal lung cells. GST Pi expressed both in lung cancer cells and normal lung cells. However, in H1355 cells, GST Pi can not be detected by RT PCR. Undetectable expression of GST M2 in H1355 was not caused by the deletion of genomic DNA. The reduced expression GST M2 in H1355 cells can not be restored after treatments with histone deacetylase inhibitor: TSA or/and demethylation agent: 5-aza-dC. Neither the methylation of CpG in promoter nor the histone deacetylation contributed to the reduced expression of GST M2 in H1355 cells. Further investigations will be needed to clarify the mechanisms of GST M2 down regulation in lung cancer cells. Additionally, overexpression of GST M2 in H1355 cells

would alleviate B[a]P-mediated S and G2/M phase accumulation. Therefore, these results of this study suggest that lung carcinogenesis and poor prognosis of overall survival were associated with the reduced expression of GST M2 gene.

緒言:

隨著工業的發展，人類接觸到各種化學物質的機會也越來越多；例如工業發展所產生的廢氣、廢水或廢棄物，汽車排放的廢棄或二手煙的暴露，農產品中的農藥殘留與食品中的添加劑等等，對於人體而言均屬於外來物質(Xenobiotics)。而這些外來物質包含有機與無機化合物，其中包括多環芳香烴化合物、化療藥物、黃麴毒素與石棉等等，這些非人體自然產生的化學物質其中某些經由 cytochrome p450 代謝後會增加本身的活性並與細胞內的巨分子結合，進一步產生致癌性、致突變性與細胞毒性；此外這些外來物質也會影響人體內的賀爾蒙、細胞激素與脂肪酸的氧化代謝。外來物質在進入人體後可經由三個路徑加以代謝並排出體外，其代謝的第一階段為：

Phase I : 主要是由 epoxide hydrolase 及 cytochrome P450 所負責，代謝途徑為氧化反應、還原反應與水解反應。

Phase II : 主要是由特定的酵素所負責，例如麩胱甘肽轉移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 、Glucuronyl transferase，藉由酵素的作用使得外來的物質具有極性。

第二階段：

Phase III : 主要為細胞膜上的 transporters ; 這些 transporters 在未受刺激時即大量表現，然而若受到外來毒性物質刺激時可更

進一步的被誘發表現。例如 P-glycoprotein (P-gp)、 multidrug resistance-associated proteins (MRPs)、organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2)等，大量分佈於肝臟、小腸、腎臟與腦部組織，可調整對於藥物的吸收、分佈與排除。

所有的外來物質最後都必須要經由排泄系統離開人體，若長時間大量累積在人體的組織或器官內即會造成危害；一般而言外來物質大多屬於非極性物質，所以必須經由酵素的作用提升物質極性以增加水溶性，如此才能經由尿液或汗液排出，而麩胱甘肽轉移酶在此過程中扮演重要的角色。

當香菸中的 B[a]P 進入細胞後可透過兩個路徑進行代謝；B[a]P 在細胞內主要是透過 P450 的作用分別代謝為 benzo[a]pyrene 4,5,-oxid 及 (+) benzo[a]pyrene 7,8-oxid。前者對細菌而言是一種很強的致突變物，但對哺乳類細胞並沒有很強的毒性，因為哺乳類細胞可藉由 Epoxide hydrolase 將其代謝為不具毒性的 benzo[a]pyrene 4,5-dihydrodiol。而對 (+) benzo[a]pyrene 7,8-oxid 而言，雖然哺乳類細胞內的 Epoxide hydrolase 亦可將其代謝成較不具毒性的 (-) benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol，但是細胞內由毒性物質活化的 P450 與 prostaglandin H synthase 或 aldoketo reductase (AKR) 與 Dihydrodiol dehydrogenase 會進一步的將 (-) benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 分別代謝成 (+) benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide 或 catechol。此外，catechol 亦可再經過氧化反應代謝成 ortho-quinone；因此 B[a]P 在人體最終可代謝成三種產物，而除了 benzo[a]pyrene 4,5-dihydrodiol 並不具有毒性之外，其餘的兩種最終代謝產物對細胞都具有毒性。其中 (+) benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide 由於立體結構上的改變，具有對抗 Epoxide hydrolase 將其水解的能力，同時更可共價鍵結到 DNA，並進一步造成人類的 ras 基因發生

突變而誘發肺癌或皮膚癌。而細胞亦可藉由 phase II 酵素的活化來進行解毒過程；GST 是細胞中主要的 phase II 解毒酵素，GST 可催化 GSH 與外來的毒性物質形成鍵結，由於 GSH 鍵結物具有較高的親水性，因此非常容易由細胞膜上的 transporters (1) 主動運送到細胞外，而這個運送過程是單向且不可逆的；因為與外來毒性物質鍵結的親水性 GSH 部分可防止毒性物質再次進入細胞，而最後這些毒性物質以 mercapturic acids 的形式排出體外 (2)。**麩胱甘肽轉移酶的功能與重要性：**

在人類的組織中，有許多不同的細胞保護機制存在；而這些機制可保護 DNA 不受 BPDE 傷害 (3-5)。其中，麩胱甘肽轉移酶是細胞中主要的 phase II 解毒酵素，麩胱甘肽轉移酶可催化 GSH 與 BPDE 形成共價鍵結；此一機制被認為是細胞中避免 BPDE 傷害的重要過程 (4, 6)。麩胱甘肽轉移酶依其序列不同可分為五種類型 (Alpha、Mu、Pi、Theta、Zeta) (7)，它可催化麩胱甘肽 (GSH) 與親電性的受質結合以降低細胞外在或內部有毒物質的傷害 (8)；而人類的組織中也存在著多種不同種類的 GST，某些不同的麩胱甘肽轉移酶亦可催化相同的受質 (9, 10)。在人類的大腸癌、膀胱癌、卵巢癌、肺癌及胃癌的組織中，麩胱甘肽轉移酶-Pi (acidic 麩胱甘肽轉移酶) 的 RNA 表現量是正常組織的 2-4 倍 (11)；而麩胱甘肽轉移酶-alpha 在對烷化類藥物具抗藥性的細胞中有明顯的活性表現 (12, 13)。在前腫瘤結節中，Alpha、Pi 及 Mu 類的 GST 都有明顯的表現，一但形成腫瘤後就只有麩胱甘肽轉移酶-Pi 的表現量最明顯。Mu-class 及 pi-class 的麩胱甘肽轉移酶可催化多種受質，其中包括 PAH (多環芳香烴類) 中的 B[a]P-diolepoxide (BPDE)，還有丙烯醛與某些經由脂質過氧化所產生的不飽和羰基代謝物和受到氧化性傷害的 DNA (5, 9, 14)。多環芳香烴類之 diol epoxides 代謝物對細胞所造成的毒性可藉由麩胱甘肽轉移酶作用而降低，其中以 Mu 家族之麩胱甘肽轉移酶對於多環芳香烴類之代謝物 (例如:BPDE) 的活性最

強 (15-17)；其次為麩胱甘肽轉移酶P1-1與麩胱甘肽轉移酶A1-1(18)。然而，目前對於麩胱甘肽轉移酶與肺癌發生的相關研究大多侷限於針對麩胱甘肽轉移酶-P1或麩胱甘肽轉移酶-M1的基因表現與其多型性的分析，缺鮮少針對麩胱甘肽轉移酶-M2進行功能性的探討。

近來的研究指出，Mu家族中的麩胱甘肽轉移酶-M2可專一性的將catecholamine代謝成為quinones (例如將dopamine氧化代謝成dopaminochrome)；而麩胱甘肽轉移酶-M2大量表現於腦部及睪丸中，對於腦部的氧化性傷害也具有保護的作用(19)，但也有研究指出麩胱甘肽轉移酶-M2亦少量表現於肺部組織中(20)。麩胱甘肽轉移酶-M2主要以具有水溶性的二單元體蛋白 (dimeric protein)形式存在，所表現的分子量為25 kDa左右，而每一單元體都具有兩種不同的活化位置，其中具有親水性的G-site可和生物體中的受質-GSH結合，另外鄰近的H-site可避免環境中厭水性物質與GSH鍵結後的親電性鍵結物結合(21)。至於麩胱甘肽轉移酶-M4則是1993年由Comstock..等人所發現，它與麩胱甘肽轉移酶-M1、M2及M3分別具有87%、83%及70%的相似性；而麩胱甘肽轉移酶-M4對於受質CDNB的催化能力並不高(1.39±0.21 μ mole/min/mg)，以Northern blot分析麩胱甘肽轉移酶-M4在細胞及人類組織中的分佈，發現其在多種腫瘤細胞中都會表現，例如人類的肺腺癌細胞株(SK-Hep-1 cell line)、肝癌細胞株(HepG2 cell line)、子宮頸癌細胞株(HeLa cell line)及乳癌細胞株(MCF-7 cell line)均有麩胱甘肽轉移酶-M4的表現；此外在人類的組織中也發現，麩胱甘肽轉移酶-M4表現於心臟、腦部、肝臟、骨骼肌、脾臟、胎盤、肺臟及腎等器官中(22)。

香菸中的成分與肺癌發生的關係：

香菸在燃燒時會產生兩千以上的化學物質，其中以Benzo(a)pyrene為較重要的致癌物，Benzo(a)pyrene(B(a)P)在體內經由代謝活化之後，可轉變成為具有高度致

癌危險的代謝物 - benzo(a)pyrene-diol-epoxide (BPDE)；而此代謝物與鍵結誘發突變也因而可能造成肺癌的發生(23)，而BPDE可與DNA產生共價鍵結進而形成DNA adducts，此一反應在由B[a]P所引起之腫瘤生成中扮演重要的角色(24)。前人的研究也提到，香菸中的許多致癌物質與體內的BPDE-DNA傷害物的含量有關，這也反應出個體之間對於這些致癌物質的感受性不同(25)；因此BPDE被認為是對人體最直接的致癌物質，所以BPDE也就經常被當作菸草中的致突變物質來研究相關的癌症生成。針對BPDE這種顯著的特性，可由基因學的角度來評估吸煙者的肺部對於由BPDE造成之DNA傷害的敏感性；並藉此評估發生癌症的危險性。由抽煙引起的肺癌與致癌物質的劑量及個體基因上的差異有關，其中基因與環境之間的作用可能是造成個體基因缺失的危險因子；BPDE與DNA形成之鍵結物對於抽煙相關之癌症生成扮演了重要的角色，BPDE與DNA鍵結物對個體造成的影響與個體先天上的感受性差異有關。不同的個體或細胞之間對於DNA傷害之修復能力有所不同，而這也就意味著個體與細胞之間有不同的癌症發生危險性。

當香菸中的Benzo(a)pyrene進入細胞時，細胞中的保護機制便會開始啟動；細胞中的phase I解毒酵素主要存在於細胞中的微粒體，而phase I酵素P450首先將Benzo(a)pyrene代謝成epoxide類的化合物，接著epoxide hydratase進一步的epoxide類的化合物轉換成diol epoxide的化學物質，而P450會將此類的化學物質轉換成具有致癌性及致突變性的外來毒性物質；此時細胞開始進行phase II的解毒過程，麩胱甘肽轉移酶是細胞中主要的phase II解毒酵素，麩胱甘肽轉移酶可催化GSH與外來的毒性物質形成鍵結，而這些與GSH鍵結物具有較高的親水性，因此非常容易的透過擴散的方式由細胞膜上的幫浦(GS-X pump)(26)主動的運送到細胞外，而這個運送過程是單向且不

可逆的；因為與外來毒性物質鍵結的親水性 GSH 部分可防止毒性物質再次的擴散進入細胞，而最後這些毒性物質以 mercapturic acids 的形式排出體外 (2)。

麩胱甘肽轉移酶與抗癌藥物抗性及其預後關係

麩胱甘肽轉移酶有三類：一、cytosolic GSTs 二、mitochondria GSTs 三、microsomal GSTs 除了解毒可移除親電性外來毒物外，如：致癌物、環境污染物及抗癌藥物。尚具有氧化壓力下二次代謝產物如：內生性 α,β 不飽和醛基、quinones、epoxides 及 hydroperoxides 的去活化。而這些酵素涉及 leukotrienes, prostaglandins, testosterone 及 progesterone 和 tyrosine 的分解(27)。通常肺癌伴隨著 GST-Pi form 表現的增加而增加了化療的抗藥性，因 GST-Pi 抑制了 ASK-JNK 的訊息傳遞導致細胞不易凋亡，所以產生嚴重抗藥性(28)。目前也發展了一些 GST 的抑制劑擬減緩化療抗藥性或達到發展化療的效果(29, 30)。GSTZ-1 缺乏的小鼠，易累積 maleylacetoacetate 造成高劑量的氧化壓力，然而氧化壓力下會誘導 cis-element 上的 Antioxidant Response element 而誘導其他酵素活化(31)。與肺癌的關係而言許多研究學者研究分析 GST-M1, M4, T1 及 Pi 的多型性與肺癌關係，最近較清楚的是 GST-T1 null 即 GST-T1 缺失的基因型增加了肺癌發生率，特別是在年輕的族群(32)。我們相信不同 GST 的 isoforms 其序列不同，所催化的受質也應不同。最近本研究室證實了穩定表現 GST-M2 之 H1355 細胞株可降低 BPDE 所造成的 DNA-adducts，同時也可減緩經由處理 BPDE 後所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異(33)。

實驗步驟：

(1) 以 REAL-TIME 定量 PCR 分析 H1355 細胞內之 GST-M2 mRNA 表現量

為了要分析在處理不同濃度的 BPDE

劑量下，是否會改變細胞內 GST-M2 mRNA 的表現量，因此首先將細胞培養於含有 5 % fetal bovine serum、100 U/ml penicillin/streptomycin 及 1 ml/100 ml L-glutamine 的 RPMI-1640 培養液中，其培養條件為 37°C 並含有 5% CO₂ 的細胞培養箱。在進行實驗之前，將固定數目 (1 x 10⁶ cells/5 ml) 的細胞培養於 6-cm 的培養皿並於細胞培養箱培養 18 小時。接著，將每一組細胞分別處理 2 μ M、1 μ M 與 0.5 μ M 的 BPDE 或 5 μ M、2.5 μ M 與 1.25 μ M 的 B[a]P，於 4 小時後萃取細胞的 RNA (2 μ g) 並合成 cDNA (20 μ l) 再以即時定量 Real time PCR 分析 GST-M2 mRNA 的表現量是否受到 BPDE 所影響。本實驗所使用的定量 PCR 儀器為 ABI Perkin Elmer 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)，每組反應中包含有 10 μ l 的 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)，1 μ l 的 300nM probe (Applied Biosystems, Assay-on-Demand gene expression products, Hs00265266-g1) 與 1 μ l 的五倍稀釋 cDNA；其餘的體積補水至 20 μ l。定量 PCR 的反應條件為：50°C-2 分鐘，95°C-10 分鐘，接著以 95°C-15 秒，60°C-60 秒進行反應並重複 40 循環，最後再以 95°C-15 秒，60°C-20 秒，95°C-15 秒。而為了要比較 GST-M2 基因的表現量，本實驗同時亦取 1 μ l 的五倍稀釋 cDNA 分析 house-keeping gene GAPDH 於 H1355 細胞中的表現量，以作為 internal control。在定量 PCR 反應的過程中，儀器會紀錄每個週期數所產生的螢光值，形成 sigmoidal-shaped amplification plots，當螢光達到閾值 (threshold) 時，會紀錄其週期數，稱之為 C_T (threshold cycle) 值，即是剛達到可以偵測到螢光的週期數。

$$\Delta C_T = C_{T(\text{target gene})} - C_{T(\text{GAPDH})}$$
$$\text{ratio} = 2^{-\Delta C_T}, \text{表示此基因的相}$$

對表現量

(2) 萃取 genomic DNA

將 H1355 及已大量表現麩胱甘肽轉移酶 -M2 之 H1355 細胞以 5 x 10⁶ cells/dish 的

密度培養於 10-cm 的細胞培養皿，待 18 小時後處理不同濃度的 BPDE 並於 24 小時後萃取細胞的 genomic DNA。首先，將 lysis buffer (10 mM Tris, 0.1 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0) 加入細胞培養皿中，輕輕搖晃使其均勻分布到整個培養皿表面，再置於冰上作用 2 分鐘；接著將細胞均質液自培養皿吸出並轉移到微量離心管中。加入 RNase A (250 µg/ml; Sigma, St. Louis, MO) 並於 37°C 作用 60 分鐘，再加入 proteinase K (10 mg/ml; ROCHE) 於 55°C 作用 12 hr。所有的細胞均質液再以 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1, v/v/v) 萃取兩次後離心 12000 xg，10 分鐘後將上清液轉移自新的微量離心管，再加入 2.5 倍體積的 95% 酒精。輕輕搖晃使其與酒精混合直到產生絲狀沉澱物為止。將所產生的絲狀物以 Tip 小心挑出並轉移到另一新的微量離心管，再以 70% 的酒精清洗兩次，最後將殘留的酒精抽乾並溶水及測定 DNA 濃度。

(3) GST-M2 promoter 甲基化分析

首先將 H1355 肺癌細胞株，種植 1×10^5 細胞於 10 cm 培養皿培養 18 h 後，分別單獨處理 (1) histone deacetylase (HDAC) inhibitor : TSA (0.5 µM) 120 h 或 (2) demethylation agent: 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) (1 與 10 µM) (20 mM dissolved in dimethyl sulfoxide) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)，以及 (3) 先將 H1355 細胞處理 10 µM 5-aza-dC 96 h 後，再加入 0.5 µM TSA，共同處理 24 h 後，分別將細胞株萃取得到之 total RNA (2 µg)，以 Oligo d(T)₁₈ (NEW ENGLAND BioLabs, Cat.NO.S1316S) 合成 cDNA。接著再以 1 µl 之 cDNA 與 GST-M2 及 GST-Pi 和 β-actin 等專一性 primer 利用鏈聚合酶連鎖反應 (PCR) 進行 34 cycle 之基因增

幅，其所用之 primers 序列表示於 (Table.1)。PCR 反應條件如下：denature：95°C、5 min，【denature：95°C、1 min，annealing：55°C、1 min，elongation：72°C、2 min】進行 33 cycle，最後以 72°C 反應 10 min。PCR 反應主要是以 MJ RESEARCH PTC-200 PCR system 進行。

(4) 分析細胞週期變化

首先將細胞分盤至 60 mm 培養皿中，每個培養皿細胞數為 5×10^5 個，靜置 37°C 培養箱 16 hr。接著將舊培養液移除，以 1×PBS 清洗兩次後，添加不同濃度的 BPDE (0.5、0.25、0.125 µM)，並處理 12 小時後收細胞，步驟如下：首先將舊的培養液移至 15 ml 離心管中，並用冰的 1×PBS 清洗細胞兩次；接著用 1×Trypsin-EDTA 將細胞打下，再加入舊的培養液終止反應並將懸浮細胞的培養液移到 15 ml 離心管。於室溫下離心 800 rpm 5 min 後，將上清液去除，再用冰的 1×PBS 清洗兩次，最後緩緩邊加邊搖的加入 1 ml 的 70% 冰酒精，置於 4°C 冰箱中以固定細胞。第二天，將固定於細胞 70% 冰酒精的細胞離心 800 rpm、5 min，之後移除上清液並用冰的 1×PBS 清洗兩次，再移除上清液並盡量倒乾。此時每管分別加入 1 ml 之 propidium iodide mixture (1% Triton X-100、0.5 mg/ml RNase A 與 4 µg/ml propidium iodide 溶於 1 ml 的 PBS，PI stain 須避光)。靜置室溫並避光反應 30 min 後，用 40 µm nylon mesh (Falcon) 過濾細胞，以避免過大的細胞群塊或雜質阻塞流式細胞儀之樣品吸入孔，把單細胞懸浮液收集在流式細胞儀專用管中。

為偵測細胞內 DNA 含量，本實驗使用 Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) 系統，以流式細胞儀 (FACSCalibur，

BECTON DICKINSON) 作分析。利用壓力將待測細胞在鞘液的包圍下呈單行排列，依次通過雷射照射區，由雷射光源激發出 488 nm 波長的光波激發到細胞上，會依細胞的不同特性而產生不同的螢光與光散射，在雷射光束垂直的 90° 位置收集紅色螢光訊號 (617 nm)，可偵測細胞中染上 PI 的 DNA 含量，藉此將不同 DNA 含量的細胞以 CELL Quest 軟體作紀錄。每秒測量約 90-120 個細胞，每組測量 10,000 的細胞。最後再利用 Mod Fit 3.0 版軟體，將處於不同細胞週期的細胞數百分比作區別與統計分析。

(5) 以西方轉漬法分析發炎基因之蛋白表現

將欲分析之細胞先以冰的磷酸緩衝液清洗後再經由 TE 溶液作用，將細胞懸浮液以超音波破碎。將細胞懸浮液離心 12000xg，10 分鐘後取上清液測定蛋白濃度 (Bradford) (34) 並以西方轉漬法分析蛋白表現。首先，取 50 μ g/lane 的蛋白濃度以 15% 之 SDS-PAGE 進行分析，之後利用半乾式蛋白轉移裝置將蛋白轉移至 Hybond-P membrane (90 mA, 1.5 hr)。待蛋白轉移完成後，以含有 3% 脫脂牛奶之磷酸緩衝液 (含有 0.1% tween-20) 與 Hybond-P membrane 在室溫下作用 60 分鐘，其目的是為了減少非特異性鍵結的產生。接著將蛋白與專一性之抗體 (1000 稀釋之 rabbit polyclonal anti-human 抗體)，抗體以含有 3% 脫脂牛奶之磷酸緩衝液 (含有 0.1% tween-20) 稀釋後於 4°C 作用 18 小時或於室溫下作用 1 小時。

蛋白與抗體反應完畢後，再以含有 3% 脫脂牛奶之磷酸緩衝液 (含有 0.1% tween-20) 清洗數次；接著將蛋白與專一性二次抗體於室溫下反應 60 分鐘 (horseradish peroxidase-conjugated goat antirabbit IgG for human inflammation Ab, 10000 稀釋)。最後以含有 3% 脫脂牛奶之磷酸緩衝液 (含有 0.1% tween-20) 清洗數

次，並利用 Enhanced Luminol Chemiluminescence (ECL) Reagent (NEN, Boston, USA) 進行呈色反應。

結果:

先前的研究提到，GST-T1、P1 與 M1 於肺組織中的基因多型性表現被認為是肺癌發生的潛在危險因子，為了要釐清是否 H1355 細胞株與其他細胞中的 GST 基因表現有所差異而使得 H1355 細胞面對 BPDE 攻擊時容易使得細胞內的基因發生異常；因此本研究收集正常的肺細胞株與肺癌細胞株，並進一步萃取 RNA 及合成 cDNA，再利用專一性的 primer 分析各種不同類型的 GST 於細胞中的表現情形。本實驗分析肺正常細胞株 (MRC-5、WI-38 與 Beas-2B) 和肺癌細胞株 (H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、CL 1-0 與 CL 1-5)，進一步萃取 RNA 再合成 cDNA，接著利用專一性的 primer 以 RT-PCR 增幅方式分析 GST Pi 和 GST M2 於細胞中的表現情形。由圖一 A 顯示，由於 β -actin 是細胞內的 housekeep gene，其表現量在肺正常細胞株 (MRC-5、WI-38 與 Beas-2B) 與肺癌細胞株 (H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、CL 1-0 與 CL 1-5) 中一致，因此本實驗以 β -actin 作為定量依據。首先，無論在肺正常細胞株 (MRC-5、WI-38 與 Beas-2B) 還是肺癌細胞株 (H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、CL 1-0 與 CL 1-5) 中皆可發現 GST Pi 的表現，與 (30, 35, 36) 等人的報告相同。但只有 H1355 肺癌細胞株測不到 GST Pi 的表現量。值得注意的是，GST M2 則在正常肺細胞株中皆有表現，可是，肺癌細胞株中幾乎偵測不到 GST M2，唯有 H1299 和 Calu-1 二種肺癌細胞中有些許的表現，且其表現量遠比正常肺細胞株低。不過，由楊泮池教授建立的肺腺癌細胞株 CL 1-0 與 CL 1-5 均可發現 GST M2 的存在，而這現象未來將再進一步探討。因此，本實驗接著以 Real-time PCR 來進行定量 (圖二 B)，對照圖一 A 和 B 的結果發現，GST M2 在正常肺細胞株中 (MRC-5 和 WI-38) 有很高的表現，幾乎是肺癌細胞株

(H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23)的 10-15 倍，而在肺癌細胞株(H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23)的表現量遠比正常肺細胞低甚至不表現。綜合 RT-PCR 和 Real-time PCR 的結果顯示，肺癌細胞的 GST M2 基因表現量比正常肺細胞低，因此，本實驗進一步探討 GST M2 在肺癌細胞中表現量降低的原因。

研究報告指出，細胞中調控基因表現的主要機制有 DNA 甲基化(methylation)、突變(mutation)與 LOH(loss of heterozygosity)(37)。然而在肺癌細胞中 GST M2 表現量降低的機制尚未明朗，因此，本研究依此三大方向進行探討。(一)是否因 genomic DNA 缺失導致肺癌細胞中 GST M2 不表現-首先，萃取肺正常細胞株(MRC-5 與 WI-38)和肺癌細胞株(H1355、H1299、A549、CH27、H23、CL 1-0 與 CL 1-5)中的 genomic DNA 並針對 GST M2 DNA 的跨 exon-intron 部份設計專一性的 primer，再以萃取出來的 genomic DNA 當模板，以 PCR 的方式偵測 GST M2 DNA 的表現。由 PCR 結果顯示(圖二 A)，無論是正常或肺癌細胞株中皆有 GST M2 基因的存在，然而，再次以 RT-PCR 分析 GST M2 mRNA 的表現卻呈現不同的差異(圖二 B)。(二)是否因 GST M2 promoter 被甲基化而使基因失去表現-轉錄基因表現量低，包括一些抑癌基因或 DNA 修補基因等，可能由於其啟動子(promoter)被修飾：如啟動子的 CpG 發生甲基化(methylation)(38)或組織蛋白去乙酰化(histon deacetylation)會造成基因不表現，並與癌症的發生有關 (39, 40)。Virmani 等人發現，在 H1355 細胞中 GST Pi 因為被高度甲基化而不表現，因此，本研究將 GST Pi gene 當此甲基化及去甲基化實驗的正對照組。首先將 H1355 細胞分別單獨處理

(1)histone deacetylase (HDAC) inhibitor : TSA(0.5 μ M)120 h 或(2) demethylation agent : 5-aza-2'- deoxycytidine(5-aza-dC)(1 與 10 μ M)，以及(3)先將 H1355 細胞處理 10 μ M 5-aza-dC 96 h 後，再加入 0.5 μ M TSA，共同處理 24 h 後，萃取其 RNA 並合成 cDNA，最後利用 RT-PCR 分析 GST M2、GST Pi 和 β -actin 的表現情形。由圖三的結果顯示，未處理 5-aza-dC 或 TSA 的 H1355 細胞皆偵測不到 GST M2 與 GST Pi 的表現。但是，當 H1355 細胞單獨處理 5-aza-dC，利用 RT-PCR 分析後，可觀察到 GST Pi 的表現，其表現量隨著 5-aza-dC 處理濃度增加而增加，呈現一個劑量反應關係，即表示 GST Pi 在 H1355 細胞中經由 5-aza-dC 去甲基化後，可回復基因的表現，但是，單獨處理 TSA 的 H1355 細胞經 RT-PCR 分析後，則並無發現 GST Pi 的表現。5-aza-dC 和 TSA 共同處理細胞，由 RT-PCR 分析，可觀察到 GST Pi 回復。可是，本實驗中 GST M2 並不會因為 5-aza-dC 或 TSA 處理而回復表現。

探討 GST M2 在 lung carcinogenesis 中所扮演的角色

研究顯示，GST 對於 BPDE 造成細胞傷害扮演一個重要的保護角色 (18, 41)。然而，GST Mu 家族中以 GST M2 代謝 PAH 類之 diol epoxides 的活性最強(20)，並且已被證實可有效減少 BPDE 鍵結物。過去本實驗室已將 MRC-5 細胞內的 GST-M2 基因穩定表現於肺 H1355 細胞內，同時也將 H1355 細胞株本身的 GST-M4 大量表現，以便更清楚了解兩者在 BPDE 對細胞所造成的傷害反應中扮演何種角色。分析 GST M2 是否可恢復 B[a]P 造成的細胞週期的變化

將 H1355, H1355/empty vector transfectants, H1355/GST M2 transfectants 細胞處理不同濃度(0、0.05、0.1、0.2、0.5 μM)B[a]P 後，於 24 和 48 h 收細胞並進行流式細胞儀的分析。Fig. 10 結果顯示，當處理 0 和 0.05 μM B[a]P 24 h 後，H1355 細胞 S phase 的比例分別為 $31.9 \pm 1.8\%$ 和 $64.3 \pm 2.0\%$ ，而穩定表現 empty vector 的 H1355 細胞其 S phase 的比例分別為 $33.8 \pm 2.3\%$ 和 $55.5 \pm 2.0\%$ ，大約增加 20-30%，顯示以 B[a]P 處理 H1355 與穩定表現 empty vector 的 H1355 細胞，有明顯的 S phase 停滯現象；在相同的條件下，穩定表現 GST M2 的 H1355 細胞其 S phase 比例為 $44.6 \pm 1.2\%$ 和 $51.4 \pm 1.0\%$ ，大約只增加至 10%。此外，當處理 0.1、0.2、0.5 μM B[a]P 24 h 後，也都可以發現 GST M2 具有抵抗 B[a]P 造成細胞週期 S phase 停滯的現象。

接著，為了要確認 GST M2 確實具有抵抗 B[a]P 造成細胞週期 S phase 停滯的能力，因此，進一步將 H1355/GST M2 transfectants 細胞預先處理非受質結合型 GST 抑制劑(ANS, 200 μM)1 h 後，再分別共同處理 0、0.05、0.1、0.2、0.5 μM B[a]P，24 h 後收細胞並進行流式細胞儀的分析，其圖四 A 結果顯示，處理 0 和 0.05 μM B[a]P 24 h 後，其 S phase 的比例分別為 $24.8 \pm 3.0\%$ 和 $44.2 \pm 2.1\%$ ，大約增加了 20%，明顯的回復 B[a]P 造成 S phase 停滯現象。

圖四 B 的結果顯示，當 H1355 處理 0、0.05、0.1 μM B[a]P 48 h 後其 G2/M phase 的比例分別為 $12.0 \pm 3.6\%$ 、 $25.5 \pm 3.6\%$ 、 $52.4 \pm 1.9\%$ ，而 H1355/empty vector transfectants 細胞株，其 G2/M phase 的比例分別為 $20.8 \pm 0.6\%$ 、 $42.4 \pm 0.3\%$ 、 64.4 ± 1.9 ，細胞週期由原本的 S phase 累積變成 G2/M 累積。在相同的條件下，穩定表現 GST M2 的 H1355 細

胞其 G2/M phase 比例為 $17.4 \pm 2.4\%$ 、 $15.5 \pm 1.6\%$ 、 $22.0 \pm 1.3\%$ ，G2/M phase 大約只增加了 5%。因此有 GST M2 表現時，幾乎可以減少 B[a]P 造成細胞週期 G2/M phase 累積。為了進一步確定 GST M2 存在下可有效減緩 B[a]P 造成 G2/M phase 的累積，因此，將 H1355/GST M2 transfectants 細胞預先處理非受質結合型抑制劑(ANS, 200 μM)1 h 後，再共同處理不同濃度的 B[a]P，於 48 h 後進行流式細胞儀的分析，由 Fig. 11 的結果顯示，處理 0、0.05、0.1 μM B[a]P 48 h 後，其 G2/M phase 的比例分別為 $12.5 \pm 0.2\%$ 增加至 $47.2 \pm 0.5\%$ ，大約增加了 35%，明顯的回復 B[a]P 造成 G2/M phase 停滯現象。

先前的研究證實，穩定表現 GST-M2 之 H1355 細胞株可降低 BPDE 所造成的 DNA-adducts。因此，本研究計畫提出假設 GST-M2 可透過 GSH 結合 BPDE 所造成的發炎介質使其易排出細胞外，因此擬分析麩胱甘肽轉移酶-M2 是否也會減緩發炎反應。發炎反應會誘發環氧化酶-2 (COX-2) 的表現 (42)。所以，使用穩定表現 GST-M2 之 H1355 細胞株及原始 H1355 細胞株，處理 B(a)P 後，觀察 COX-2 蛋白的變化量，結果發現 B(a)P 並不會誘發原始 H1355 細胞 COX-2 蛋白(圖五)，可能並不會誘發發炎反應。

討論：

人體暴露於化學物質時，會造成 DNA 傷害並導致許多基因上的缺失，並且也會加速正常細胞往惡質化生長的過程(43)。GST 是 phase II 酵素中，主要代謝解毒各種具有親電性的外來物質，例如：致癌物、環境污染物，另外也牽涉細胞抵抗化療藥物，造成抗藥性的發生。因此，GST

在毒理學的領域及潛在的生理是值得深入探討與研究(27)。

然而，細胞中對抗多種致癌因子之確切的保護機轉依舊不清楚，因此，若能正確的了解存在於細胞中的保護機轉，一定能發展更有效的機制來對抗可能造成 DNA 傷害的化學暴露。目前的研究結果指出，GST 對於 BPDE 造成的傷害扮演重要的角色(18, 41)。本實驗室先前也以競爭性 ELISA 證實在肺部表現的 GST M2 可有效降低 BPDE 鍵結物，減少細胞的傷害(33)。

雖然研究報告指出，GST M2 大量表現於腦部與睪丸中(7)。但是近來以免疫組織染色分析法發現，肺組織中除了 GST Pi 和 GST A 有大量表現外，也發現有少量 GST M1、GST M2、GST M3 的存在 (20, 44)。不過，GST isoforms 中有差異的胺基酸屬於厭水性(附圖一)，因此，此區域並不適合當做抗原辨識區外，GST isoform 序列相當類似，因此，產生的抗體極有可能具有交互作用外。所以，本研究利用專一性的 GST isoforms primer 以 RT-PCR 與 Real-time PCR 分析(Fig. 1. A 和 B)，確定在肺細胞中有 GST M2 的表現，同時也發現肺癌細胞 (H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、CL 1-0 與 CL 1-5) 的 GST M2 基因表現量比正常肺細胞(MRC-5、WI-38 與 Beas-2B)低。

因此，本研究首先，以 PCR 的方式偵測 GST M2 DNA 的表現，進一步探討肺癌細胞 GST M2 表現量降低的原因？由(Fig. 2 A)結果顯示，無論正常肺或肺癌細胞株中皆有 GST M2 基因的存在，因此推測 GST M2 基因並非是 genomic DNA 缺失而造成在肺癌細胞株中 GST M2 基因表現降低。

接著將 H1355 細胞處理 demethylation agent: 5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC) 或 histone deacetylase (HDAC) inhibitor : TSA，以 RT PCR 分析後發現(Fig. 3)，在 H1355 細胞中經由 5-aza-dC 去甲基化後可回復 GST Pi 基因的表現，表示 H1355 細胞中的 GST Pi 受到高度甲基化而使基因不表現，此結果與 Virmani 等人的研究發現的結果一致 (45)。但是，GST M2 並無法受到 5-aza-dC 或 TSA 處理而回復表現。所以在 H1355 細胞中 GST M2 並非因為啟動子的 CpG 發生甲基化或組織蛋白去乙酰化而失去表現。綜合以上的實驗結果，尚未找出為何 GST M2 在肺癌細胞株中表現量降低的原因。不過，Carrillo 等人的研究報告顯示，GST M2 在年齡較高的大鼠中表現量會降低，並且對 Aflatoxin B1 較易感受，因而容易導致肝癌的發生(46)。相較於 GST Pi 家族，其 GST Mu 和 GST theta 的轉錄調控機轉較不清楚。研究指出，抗氧化物質 BHA 和 ethoxyquin 可有效的誘導老鼠的 GST M1 基因的表現，但無法卻無法有效誘導老鼠的 GST M2 的基因表現(7)。GST 會被許多結構不同的外來物質給活化，例如：PAHs、phenolic antioxidants 或 reactive oxygen species 等，在這些活化 GST 的物質中，有些是透過影響 GST 的轉錄活化這往往影響一些 GST 上游基因，老鼠的 GST A2 基因包含：antioxidant-response element(ARE)、xenobiotic- response element(XRE) 和 glucocorticoid-response element(GRE)。由於，本次實驗並無分析到 GST M2 基因上的這些更上游基因是否有發生突變的情形，導致一些轉錄因子，例如: Nrf2 等無法結合(7, 27)，而使 GST M2 表現量降低。不過，還需進一步分析探討。

B[a]P 需要代謝活化後才具有致突變性與

致癌性 (25, 47-49)，與人類肺癌的形成有關，同時，也會增加肺癌發生的風險 (50, 51)。B[a]P 透過 P450 peroxidase 造成 radical cations 的產生 (49)；或 P450 1A1/epoxide hydrolase(EH) 形成 benzo[a]pyrene diol-epoxide(BPDE)；或由 aldo-keto reductase(AKR)(human AKR1A1, AKR1C1- AKR1C4) 導致 o-quinones reactive oxygen species(ROS)(52)。Guo 等人發現 BPDE 會造成 H1299 細胞週期 S phase 的堆積，進而造成 DNA 傷害 (53)。因此，本研究同時也以流式細胞儀分析 H1355、H1355/empty vector transfectants 與 H1355/GST M2 transfectants 細胞株，在處理不同濃度 0、0.05、0.1、0.2、0.5 M B[a]P，於 24 和 48 h 的細胞週期變化。Fig. 10 與 Fig. 11 結果顯示，在處理 B[a]P 24 h 時會造成 H1355 與 H1355/empty vector transfectants 細胞週期 S phase 的累積，但是，48 h 後，細胞週期由原本的 S phase 累積變成 G2/M 累積。不過，當穩定表現 GST M2 的 H1355 細胞株，則可減緩 B[a]P 造成細胞週期 G2/M 累積的比例。

而 S phase 的增加也表示細胞內的 DNA 正在大量的被複製 (replication)；而先前的研究也指出當細胞暴露 BPDE 時，會使得 p53 基因的某些位置發生點突變而使得 P53 在 G1/S checkpoint 的功能消失，進而讓更多發生突變或需要修復的基因進入到 S phase 並被大量的複製。由於先前的文獻指出在肺癌細胞中過度表現的 GST M2 可有效降低 BPDE 鍵結物，減少細胞的傷害 (33)，因此，推測當 B[a]P 代謝成 BPDE 時，GST M2 可有效的催化 GSH 與 BPDE 結合，避免 BPDE 與 DNA 形成鍵結物，因此降低 BPDE 鍵結物的發生，進而減少 B[a]P 造成 DNA 傷害與細胞週期的變

化。

先前的研究證實，穩定表現 GST-M2 之 H1355 細胞株可降低 BPDE 所造成的 DNA-adducts，同時也可減緩經由處理 BPDE 後所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異。因此，本研究提出假設 GST-M2 可透過 GSH 結合 BPDE 所造成的發炎介質使其易排出細胞外，因此擬分析麩胱甘肽轉移酶-M2 是否也會減緩發炎反應。所以，使用原始 H1355 細胞株，處理 B(a)P 後，發現並不會增加發炎因子 Cox-2 蛋白的表現，推論可能須進一步分析其他的發炎因子，因此未來我們將利用 Superarray Gene Chip 中 inflammation pathway 的系統分析比較哪些發炎介質有改變來證實麩胱甘肽轉移酶-M2 具有會減緩發炎反應。

參考文獻

1. Xu, C.; Li, C. Y.; Kong, A. N., Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **2005**, 28, (3), 249-68.
2. Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. M.; Dowd, C. A., Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* **2001**, 360, (Pt 1), 1-16.
3. Yang, S. K.; Gelboin, H. V., Nonenzymatic reduction of benzo(a)pyrene diol-epoxides to trihydroxypentahydrobenzo(a)pyrenes by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Cancer Res* **1976**, 36, (11 Pt 1), 4185-9.

4. Sundberg, K.; Widersten, M.; Seidel, A.; Mannervik, B.; Jernstrom, B., Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chem Res Toxicol* **1997**, 10, (11), 1221-7.
5. Robertson, I. G.; Guthenberg, C.; Mannervik, B.; Jernstrom, B., Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res* **1986**, 46, (5), 2220-4.
6. Robertson, I. G.; Jensson, H.; Mannervik, B.; Jernstrom, B., Glutathione transferases in rat lung: the presence of transferase 7-7, highly efficient in the conjugation of glutathione with the carcinogenic (+)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* **1986**, 7, (2), 295-9.
7. Eaton, D. L.; Bammler, T. K., Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* **1999**, 49, (2), 156-64.
8. Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B., Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **1974**, 249, (22), 7130-9.
9. Hayes, J. D.; Pulford, D. J., The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **1995**, 30, (6), 445-600.
10. Mannervik, B.; Alin, P.; Guthenberg, C.; Jensson, H.; Tahir, M. K.; Warholm, M.; Jornvall, H., Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, 82, (21), 7202-6.
11. Moscow, J. A.; Fairchild, C. R.; Madden, M. J.; Ransom, D. T.; Wieand, H. S.; O'Brien, E. E.; Poplack, D. G.; Cossman, J.; Myers, C. E.; Cowan, K. H., Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res* **1989**, 49, (6), 1422-8.
12. Lewis, A. D.; Hickson, I. D.; Robson, C. N.; Harris, A. L.; Hayes, J. D.; Griffiths, S. A.; Manson, M. M.; Hall, A. E.; Moss, J. E.; Wolf, C. R., Amplification and increased expression of alpha class glutathione S-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, 85, (22), 8511-5.
13. Buller, A. L.; Clapper, M. L.; Tew, K. D., Glutathione S-transferases in nitrogen mustard-resistant and -sensitive cell lines. *Mol Pharmacol* **1987**, 31, (6), 575-8.
14. Hu, X.; Ji, X.; Srivastava, S. K.; Xia, H.; Awasthi, S.; Nanduri, B.; Awasthi, Y. C.; Zimniak, P.; Singh, S. V., Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch Biochem Biophys* **1997**, 345, (1), 32-8.
15. Mannervik, B.; Danielson, U. H., Glutathione transferases--structure and

- catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* **1988**, 23, (3), 283-337.
16. Hayes, J. D.; Strange, R. C., Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **2000**, 61, (3), 154-66.
17. Sundberg, K.; Johansson, A. S.; Stenberg, G.; Widersten, M.; Seidel, A.; Mannervik, B.; Jernstrom, B., Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **1998**, 19, (3), 433-6.
18. Sundberg, K.; Dreij, K.; Seidel, A.; Jernstrom, B., Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **2002**, 15, (2), 170-9.
19. Baez, S.; Segura-Aguilar, J.; Widersten, M.; Johansson, A. S.; Mannervik, B., Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J* **1997**, 324 (Pt 1), 25-8.
20. Piipari, R.; Nurminen, T.; Savela, K.; Hirvonen, A.; Mantyla, T.; Anttila, S., Glutathione S-transferases and aromatic DNA adducts in smokers' bronchoalveolar macrophages. *Lung Cancer* **2003**, 39, (3), 265-72.
21. Armstrong, R. N., Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **1997**, 10, (1), 2-18.
22. Comstock, K. E.; Johnson, K. J.; Rifkenbergy, D.; Henner, W. D., Isolation and analysis of the gene and cDNA for a human Mu class glutathione S-transferase, GSTM4. *J Biol Chem* **1993**, 268, (23), 16958-65.
23. Shinozaki, R.; Inoue, S.; Choi, K. S., Flow cytometric measurement of benzo[a]pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in normal human peripheral lymphocytes and cultured human lung cancer cells. *Cytometry* **1998**, 31, (4), 300-6.
24. Lee, B. M.; Jang, J. J.; Kim, H. S., Benzo[a]pyrene diol-epoxide-I-DNA and oxidative DNA adducts associated with gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett* **1998**, 125, (1-2), 61-8.
25. Li, D.; Wang, M.; Cheng, L.; Spitz, M. R.; Hittelman, W. N.; Wei, Q., In vitro induction of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer. *Cancer Res* **1996**, 56, (16), 3638-41.
26. Ishikawa, T., The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **1992**, 17, (11), 463-8.
27. Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R., Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2005**, 45, 51-88.
28. Adler, V.; Yin, Z.; Fuchs, S. Y.; Benezra, M.; Rosario, L.; Tew, K. D.; Pincus, M. R.; Sardana, M.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Davis, R. J.; Ronai, Z., Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* **1999**, 18, (5), 1321-34.
29. Turella, P.; Cerella, C.; Filomeni, G.; Bullo, A.; De Maria, F.; Ghibelli, L.; Ciriolo,

- M. R.; Cianfriglia, M.; Mattei, M.; Federici, G.; Ricci, G.; Caccuri, A. M., Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors. *Cancer Res* **2005**, *65*, (9), 3751-61.
30. Ricci, G.; De Maria, F.; Antonini, G.; Turella, P.; Bullo, A.; Stella, L.; Filomeni, G.; Federici, G.; Caccuri, A. M., 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of action of potential anticancer drugs. *J Biol Chem* **2005**, *280*, (28), 26397-405.
31. Blackburn, A. C.; Matthaiei, K. I.; Lim, C. E.; Taylor, M. C.; Cappello, J. Y.; Hayes, J. D.; Anders, M. W.; Board, P. G., Deficiency of glutathione transferase Zeta causes oxidative stress and activation of antioxidant response pathways. *Mol Pharmacol* **2005**.
32. Sorensen, M.; Autrup, H.; Tjonneland, A.; Overvad, K.; Raaschou-Nielsen, O., Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int J Cancer* **2004**, *110*, (2), 219-24.
33. Weng, M. W.; Hsiao, Y. M.; Chiou, H. L.; Yang, S. F.; Hsieh, Y. S.; Cheng, Y. W.; Yang, C. H.; Ko, J. L., Alleviation of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione S-transferase M2. *DNA Repair (Amst)* **2005**, *4*, (4), 493-502.
34. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-54.
35. Tew, K. D.; Monks, A.; Barone, L.; Rosser, D.; Akerman, G.; Montali, J. A.; Wheatley, J. B.; Schmidt, D. E., Jr., Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol* **1996**, *50*, (1), 149-59.
36. Wang, X.; Pavelic, Z. P.; Li, Y.; Gleich, L.; Gartside, P. S.; Pavelic, L.; Gluckman, J. L.; Stambrook, P. J., Overexpression and amplification of glutathione S-transferase pi gene in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **1997**, *3*, (1), 111-4.
37. Yamashita, S.; Tsujino, Y.; Moriguchi, K.; Tatematsu, M.; Ushijima, T., Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* **2006**, *97*, (1), 64-71.
38. Esteller, M.; Corn, P. G.; Baylin, S. B.; Herman, J. G., A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* **2001**, *61*, (8), 3225-9.
39. Iijima, H.; Tomizawa, Y.; Iwasaki, Y.; Sato, K.; Sunaga, N.; Dobashi, K.; Saito, R.; Nakajima, T.; Minna, J. D.; Mori, M., Genetic and epigenetic inactivation of LTF gene at 3p21.3 in lung cancers. *Int J Cancer* **2006**, *118*, (4), 797-801.
40. Das, P. M.; Singal, R., DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* **2004**, *22*, (22), 4632-42.
41. Fields, W. R.; Morrow, C. S.; Doss, A. J.; Sundberg, K.; Jernstrom, B.; Townsend, A. J., Overexpression of stably transfected human glutathione S-transferase P1-1 protects against DNA damage by benzo[a]pyrene diol-epoxide in human T47D

cells. *Mol Pharmacol* **1998**, 54, (2), 298-304.

42. Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M., Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1998**, 38, 97-120.

43. Harris, C. C., Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* **1991**, 51, (18 Suppl), 5023s-5044s.

44. Anttila, S.; Hirvonen, A.; Vainio, H.; Husgafvel-Pursiainen, K.; Hayes, J. D.; Ketterer, B., Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases in human lung. *Cancer Res* **1993**, 53, (23), 5643-8.

45. Virmani, A. K.; Tsou, J. A.; Siegmund, K. D.; Shen, L. Y.; Long, T. I.; Laird, P. W.; Gazdar, A. F.; Laird-Offringa, I. A., Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2002**, 11, (3), 291-7.

46. Carrillo, M. C.; Favre, C.; Carnovale, C. E.; Monti, J. A.; Alvarez, M. L.; Scapini, C.; Pisani, G. B.; Lugano, M. C., Involvement of mu class glutathione S-transferase subunit M2 (rGST M2) levels in the initiation and promotion of hepatocellular carcinogenesis in old rats. *Exp Gerontol* **2001**, 36, (2), 255-65.

47. Jiang, H.; Vudathala, D. K.; Blair, I. A.; Penning, T. M., Competing roles of aldo-keto reductase 1A1 and cytochrome P4501B1 in benzo[a]pyrene-7,8-diol activation in human bronchoalveolar H358 cells: role of AKRs in P4501B1 induction. *Chem Res Toxicol* **2006**, 19, (1), 68-78.

48. Sagredo, C.; Ovrebo, S.; Haugen, A.; Fujii-Kuriyama, Y.; Baera, R.; Botnen, I. V.;

Mollerup, S., Quantitative analysis of benzo[a]pyrene biotransformation and adduct formation in Ahr knockout mice.

Toxicol Lett **2006**, 167, (3), 173-82.

49. Cavalieri, E. L.; Rogan, E. G., Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Xenobiotica **1995**, 25, (7), 677-88.

50. Hecht, S. S., Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **1999**, 91, (14), 1194-210.

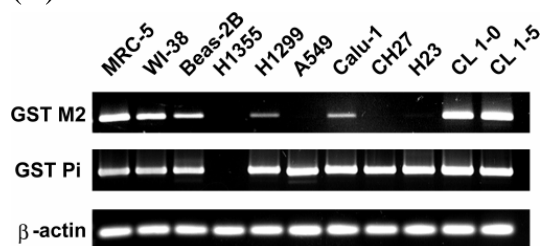
51. Veglia, F.; Matullo, G.; Vineis, P., Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2003**, 12, (2), 157-60.

52. Penning, T. M.; Burczynski, M. E.; Hung, C. F.; McCoull, K. D.; Palackal, N. T.; Tsuruda, L. S., Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol* **1999**, 12, (1), 1-18.

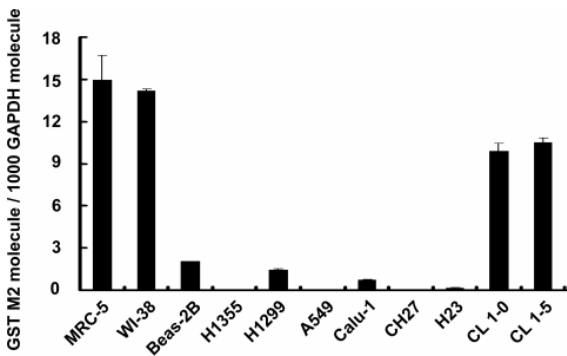
53. Guo, N.; Faller, D. V.; Vaziri, C., Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive. *Cell Growth Differ* **2002**, 13, (2), 77-86.

圖表說明

(A)



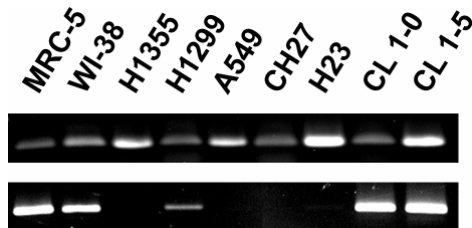
(B)



圖一

GST M2 gene mRNA expression in normal lung and lung tumor cell lines.

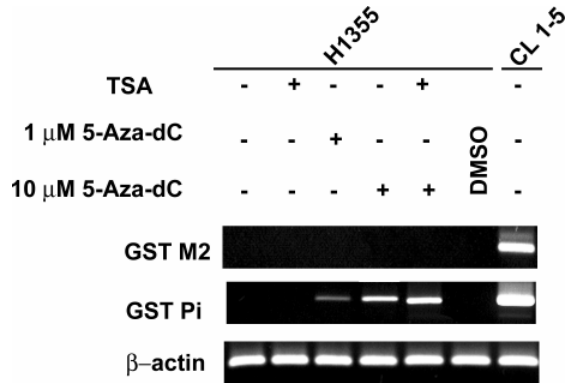
(A) Representative of GST M2 and GST Pi expression in normal lung and lung tumor cell lines. Expression was analyzed by RT-PCR of total RNA (1 µg) amplified by RT-PCR. Equal amount of DNA was loaded, as confirmed by the intensity of β-actin after ethidium bromide staining. (B) Real-time PCR quantification of GST M2 by TaqMan analysis. All values have been normalized to the level of GAPDH and are the averages of three independent readings.



圖二. GST M2 genomic DNA expression in normal lung and lung tumor cell lines.

(A) Representative of GST M2 genomic DNA expression in normal lung and lung cancer cell lines. Expression was analyzed by PCR of total genomic DNA (10 ng) amplified by

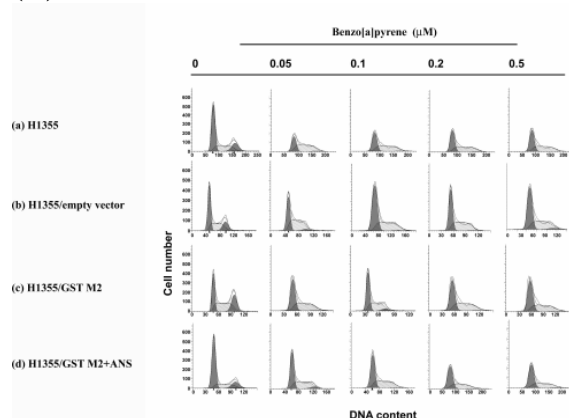
PCR. (B) Representative of GST M2 expression in normal lung and lung tumor cell lines. Expression was analyzed by RT-PCR of total RNA (1 µg) amplified by RT-PCR.



圖三、 Representative results of reactivation of GST M2 expression in H1355 lung cancer cell lines.

For the first 96 hr, cells were treated with 1 or 10 µM 5-Aza-dC or 0.5 µM TSA. For the study of synergism, 1 or 10 µM 5-Aza-dC was present in culture for 96 hr and then for another 24 hr with the addition of 0.5 µM TSA. Total RNA was then isolated and RT-PCR analysis was carried out with the GST M2, GST Pi and β-actin oligonucleotide primers.

(A)

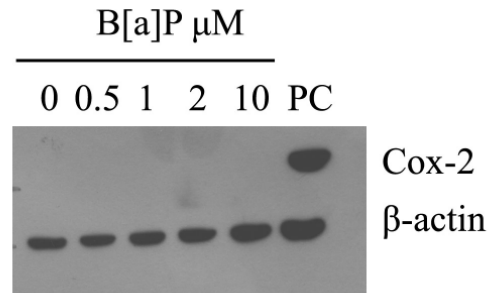


(B)

	Benzo[<i>a</i>]pyrene (μ M)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.5
G1 (%)					
H1355	51.8 \pm 0.1	34.7 \pm 0.4	39.8 \pm 7.5	48.2 \pm 0.3	43.3 \pm 8.3
H1355/empty vector transfectants	46.6 \pm 3.3	42.7 \pm 6.1	56.1 \pm 3.4	51.9 \pm 1.1	56.5 \pm 0.8
H1355/GST M2 transfectants	36.4 \pm 7.1	48.8 \pm 1.5	50.7 \pm 0.2	53.5 \pm 0.2	54.8 \pm 0.3
H1355/GST M2 transfectants pre treated 200 μ M ANS	56.3 \pm 8.7	53.1 \pm 4.1	55.3 \pm 3.7	58.1 \pm 0.1	57.6 \pm 0.2
S (%)					
H1355	30.4 \pm 0.3	63.3 \pm 0.6	60.1 \pm 7.5	50.4 \pm 0.3	52.0 \pm 2.1
H1355/empty vector transfectants	35.2 \pm 1.3	54.1 \pm 9.1	43.5 \pm 6.1	47.5 \pm 1.7	41.1 \pm 0.4
H1355/GST M2 transfectants	36.5 \pm 7.4	51.1 \pm 1.4	49.2 \pm 0.1	46.3 \pm 0.1	44.8 \pm 0.6
H1355/GST M2 transfectants pre treated 200 μ M ANS	24.8 \pm 3.0	44.2 \pm 2.1	44.3 \pm 3.6	41.9 \pm 0.1	42.1 \pm 0.6
G2/M (%)					
H1355	17.7 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2	0 \pm 0	1.3 \pm 0.1	4.5 \pm 6.0
H1355/empty vector transfectants	17.7 \pm 4.4	3.1 \pm 2.7	0.2 \pm 2.7	0.3 \pm 0.6	2.7 \pm 0.4
H1355/GST M2 transfectants	26.0 \pm 0.4	0 \pm 0	0 \pm 0	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.3
H1355/GST M2 transfectants pre treated 200 μ M ANS	18.7 \pm 5.7	2.8 \pm 2.4	0.2 \pm 0.2	0 \pm 0	0.3 \pm 0.2

圖四. Effect of B[a]P on cell cycle distribution of H1355 control cells, H1355, H1355/empty vector transfectants, H1355/GST M2 transfectants and H1355/GST M2 transfectants pre treated 200 μ M ANS.

Flow cytometry analysis of DNA content in(A)H1355 control cells,(B)H1355/empty vector transfectants,(C)H1355/GST M2 transfectantsand(D)H1355/GST M2 transfectants cells pre treated 200 μ M ANS treated with different concentrations of B[a]P for 24 h. DNA stained with PI was analyzed using fluorescence activated cell sorter(FACS)analyzer. The result is a representative of at least three independent experiments.



圖五. Cox-2 protein was not induced in H1355 cells after B[a]P treatment.

Western Blot of analysis of H1355 cells were treated with varying dosages of B[a]P for 24 h. Postive control, LPS-induced DITNCI cells Cox-2 was used as a standard.