

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫：探討 1-Nitropyrene 引發巨噬細胞株 RAW 264.7
* 名稱：cells 細胞遺傳毒性及凋亡路徑機制之研究
* *****

執行計畫學生：曾璟淇
學生計畫編號：NSC 102-2815-C-040-053-B
研究期間：102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授：李宣信

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

執行單位：中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 103年02月17日

探討 1-Nitropyrene 引發巨噬細胞株 RAW 264.7 cells 細胞遺傳毒性及凋亡路徑機制之研究

(一) 摘要

由於近來環境污染日益嚴重，導致排放過多的多苯環化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)，如 pyrene 或 nitro-PAHs 等懸浮粒子廣泛分布在環境當中。這些空氣汙染廢氣中含有大量硝化多苯環化合物，其中又以 1-nitropyrene (1-NP) 佔最多數，對哺乳類動物細胞具有毒性，並造成損害。前人的研究指出，多苯環化合物具有致癌性和致突變性。因此，在本篇研究過程中，將利用小鼠巨噬細胞株 (RAW264.7 cells) 暴露於不同濃度 1-NP，來分析細胞的存活率，檢測是否引發細胞毒性。以及利用微小核實驗 (micronucleus, MN) 與彗星實驗 (comet assay)，分析是否引發基因毒性。而在研究成果中，發現經 1-NP 處理後，將以時間及濃度依賴性的方式抑制細胞存活率，並於彗星實驗中觀察到 tail length 及 tail moment 隨著 1-NP 濃度提高，這表示 DNA 斷裂片段也隨著提高。另外，研究發現 1-NP 會使細胞產生 ROS 毒性作用，而 NO 卻無顯著影響。最後，使用活性分析套組 (activity assay kits) 研究顯示 1-NP 會導致 RAW264.7 細胞產生半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶路徑 -3、-8、-9 (cysteine-aspartic proteases -3、-8、-9, caspases-3、-8、-9) 的活化。本研究結果證實，1-NP 會引起細胞毒性及基因毒性，且其會藉由 caspases 路徑產生導致細胞受損的現象。

(二) 研究動機與研究問題

探討 1-NP 是否引發巨噬細胞株 RAW 264.7 cells 細胞毒性和基因毒性。並藉由此計畫，能更加深入探討 1-NP 引發 RAW 264.7 cells 細胞毒性和基因毒性的路徑機制。預期本研究將可獲得下列結果：(1) 利用細胞存活分析法 (MTT) 測試 RAW 264.7 cells 暴露於 1-NP 的時間依存性、濃度依存性。(2) 利用微小核實驗 (MN) 與彗星實驗 (Comet assay) 來分析 1-NP 是否經由基因毒性的方式來引發細胞的死亡。(3) 比較 RAW 264.7 cells 暴露於不同濃度 1-NP 下，ROS 與 NO 的生成量。(4) 使用活性分析套組 (activity assay kits) 研究 1-NP 是否會導致 RAW264.7 細胞產生 caspases-3、-8、-9 的活化。希望能進一步瞭解 1-NP 對 RAW 264.7 cells 在毒性上的作用機轉及調控機制。

(三) 文獻回顧與探討

3-1.1-Nitropyrene 的相關介紹

大氣懸浮微粒中含有很多致突變物或致癌物，其中來源大多是汽機車排放出來的廢氣 (Murahashi Tsuyoshi et al., 1999)。而主要成份可分為兩大類，第一類為多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)，第二類為硝基多環芳香烴 (nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons; nitro-PAHs)。在第二類硝基多環芳香烴中又以 1-Nitropyrene (1-NP) (圖一) 的含量最高，其產生主因大多為汽油的不完全燃燒或多環芳香烴硝化作用所衍生 (Gonzalez de Mejia et al., 1997)。因此，1-NP 既是環境中最豐富的硝基多環芳香烴，也是最具代表性的 (Chang et al., 2006; Moon et al., 2006; Wichmann, 2007; Albinet et al., 2007)。

研究指出 1-NP 對細菌具有致突變性，並可能促使人類和實驗動物致癌，因此，其在國際癌症研究機構 (International Agency for Research on Cancer; IARC) 被歸類於 2B 致癌物 (Lee et al., 1995; Nakanishi et al., 2001; Kim et al., 2005; Watt et al., 2007; Park and Park, 2009)。此外，根據許多流行病學研究發現這些多環芳香烴化合物與諸多種類的癌病，如肺癌、肝癌有密切地關連 (Josephy et al., 1997)。當中又以肝癌影響最有相關，因為生物體是透過肝臟微粒體 p450 酵素群代謝活化，多環芳香烴經活化後成為具有攻擊核酸能力的形式，形成巨鏈結物，致使細胞產生突變 (Yang et al., 1987; Yang et al., 1988; Frenkel et al., 1988; Leadon et al., 1988; Mauthe et al., 1995)。相較於多環芳香烴化合物屬於間接致突變性，硝基多環芳香烴化合物則不需代謝過程即具有致突變性及毒性，對生物體健康有嚴重威脅 (Rosenkranz and Mermelstein, 1983; Kim et al., 2005)。而 DNA 損害在硝基多環芳香烴化合物致突變及致癌作用過程中被視為是一個重要的角色 (Landvik et al., 2007)。

3-2.巨噬細胞 (RAW 264.7 cells) 的相關介紹

免疫反應過程中，巨噬細胞扮演相當重要的角色，巨噬細胞在免疫反應過程中，不同的階段都有參與，首先巨噬細胞吞噬抗原，刺激釋出 Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、Interleukin-1 (IL-1) 等細胞激素並呈獻抗原給 T 細胞。接著，免疫作用階段，經由 T 細胞釋出細胞激素活化巨噬細胞，參與發炎反應。巨噬細胞將非特異性免疫反應，轉換成特異性免疫反應，巨噬細胞是聯結第一道天然免疫防線和第二道特異性免疫防線的主角，可以說巨噬細胞是開啟人類自體免疫反應的鑰匙。巨噬細胞的功能可分為：發炎反應及發燒、釋放熱源 (pyrogen)、釋出不同細胞激素、影響 T 細胞的分化、影響淋巴細胞活化、影響組織再生與重整、

有抗細菌的作用、有抗腫瘤的作用、造成組織傷害。巨噬細胞也是一群組成複雜 (heterogeneous) 的細胞，它的活化牽涉到複雜的步驟，它的作用與活化程度、本身的狀態和活化的細胞激素種類及刺激本身都有關。當細胞被藥物誘導而導致死亡時可能影響上述之功能，故本實驗以巨噬細胞進行研究 (Murakami et al., 2007)。

3-3.DNA 損傷反應的相關介紹

生物體的生存取決於細胞是否可將正確完整的遺傳物質傳給下一代，為了達到這個目的，細胞發展監控機制來檢查染色體結構的完整性，並且調節細胞修復及細胞週期的進行。這個 DNA 損害反應路徑是由 sensors、transducers 及 effectors 所組成的一個訊息傳遞路徑。假如細胞受到外來物質損害，細胞會停滯在 cell cycle checkpoint，暫時允許細胞作下列的工作：修補細胞損傷；解除細胞外壓迫訊號；有效利用必需的生長因子、荷爾蒙、或營養物質。假如細胞損傷無法修補時，checkpoint 的訊號也可能活化特定的訊息路徑，而使得細胞則會走向死亡。Cell cycle checkpoint 有缺陷時會造成基因突變 (gene mutation)、染色體損害 (chromosome damage) 及非倍數染色體 (aneuploidy)，這些都會造成腫瘤的發生。許多文獻中已清楚指出 1-NP 具有細胞毒性，所以本實驗將藉由下列實驗方法來分析。

3-3-1.微核試驗 (micronucleus assay) 介紹

微核 (micronucleus; MN) 可用於化合物對染色體的誘變與致癌性的評估和預測。微核仁是人類遺傳毒性暴露的良好標記，目前已被廣泛用於識別潛在致遺傳毒性劑 (genotoxic agents)。另外，微核是染色體不穩定的指標，可用來檢查腫瘤細胞和 DNA 損害修復系統或細胞週期異常的細胞。儘管這種生物指標的廣泛使用，微核影響細胞的資料卻還是相對且具爭議。在一些細胞系統，微核被認為是細胞丟失的遺傳物質。而其他的研究表明，微核中的 DNA 轉錄活躍而其基因也能夠完全表現。近期，有證據表示微核中夾帶損壞 DNA 的因子，其積累會導致有缺陷細胞週期的 checkpoint arrest 和 DNA 修復反應，以及微核可在沒有立即引發細胞週期阻滯或導致細胞進入細胞凋亡的情況下降解。總而言之，這些發現強調微核的形成，對於在一般和 gene loss 的細胞中之染色體不穩定有重要影響 (Mariona Terradas et al., 2011)。

3-3-2.彗星電泳法 (Comet assay) 介紹

彗星實驗 (又稱單細胞凝膠電泳) 是一個簡單測量在真核細胞中脫氧核糖核 (DNA) 的鏈斷裂的方法。若 DNA 受到的損壞愈嚴重，DNA 碎段就愈多，愈小的 DNA 碎段游離速度就愈快，也游離愈遠，因而形成了彗星的尾部，而較大

的一些碎段位置則靠近細胞核，因而形成彗星的頭部。DNA 碎段的游動的程度不同使它呈現出彗星狀。如環境和職業暴露，或不同的基因毒性藥物，包括輻射，化學和oxidative stress。彗星試驗中成本、需要的材料少，靈敏度和可靠性方面在已知條件下，彗星試驗能夠提供寶貴的信息，但是，在環境和職業暴露的危險源辨識和風險評估等領域，疾病與 oxidative stress、營養、醫療監測的有效性和調查在DNA 損傷反應的個體差異，可能反映了遺傳或環境的影響。簡而言之，它是一種簡便、快速且靈敏的方法測量細胞DNA 斷裂 (Andrew Collins et al., 1997)。

3-4.Reactive oxygen species (ROS) 介紹

自然界物質必須含有成對的電子才能維持性質的穩定，而自由基則是含一個或多個不成對電子的原子或分子，其性質活潑，具有高自由能，因此，會任意的攻擊並破壞細胞結構並造成 DNA、蛋白質損傷，引起細胞質的氧化作用和脂質的過氧化，導致生物體產生衰老現象及一些疾病的引發。目前已知自由基對生物體造成的危害有發炎、老化、癌症、神經性疾病及其它相關的疾病等 ROS 的來源有許多可能性，其中可能是人體在氧化磷酸化過程中，因電子傳遞異常導致少量的氧氣轉換成 ROS (Lasso et al., 1994)，輻射線的暴露也會造成 ROS 的產生 (Paya et al., 1992)，另一方面也有可能是化學物質在體內氧化還原所導致的結果 (Halliwell et al., 1993)，包括超氧陰離子 (O_2^-)、氫氧自由基 (OH)、一氧化氮 (NO) 及一些非自由基的氧化基。而過氧化氫 (H_2O_2)、次氯酸 (HOCl)、臭氧 (O_3) 等，均是屬於非自由基的氧化基。外來物質在體內誘發 ROS 產生的化學物質之一，另外輻射線的照射也是其產生來源之一。ROS 具有高活性會攻擊體內微生物、細菌甚至是 DNA，正常人體內都含有微量的 ROS，適量的 ROS 可以使人體免於受到微生物或細菌的危害，ROS 在人體的免疫系統中扮演著重要的角色 (Dinauer et al., 1992; Curnutte et al., 1993)，但相對來說，ROS 若過量卻也同樣的會對人體組織傷害 (Chakraborti et al., 1998)，ROS 被認為與許多的疾病以及癌症有相關性，已有相關研究指出，ROS 是造成細胞以及 DNA 病變的重要因素之一 (Vallyathan et al., 1998)，因此近年來對於 ROS 研究的重要性也大幅提升。由於自由基的產生通常在粒線體和內質網和細胞膜上的 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidases (NADPH oxidase)，所以藉由 ROS 的檢測也可得知細胞的損傷程度。

3-5.半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶路徑 (Cysteine-aspartic proteases; Caspase) 介紹

Caspase 是一種以不活化形式 (Inactive precursor) 存在於細胞質中的蛋白質。若死亡訊號與細胞表面的專一受器相結合時將引發細胞凋亡，在凋亡過程中 Caspase 扮演很重要的角色 (Thornberry, 1997)。

由 Caspase 引發的細胞凋亡路徑可分為兩大類型：其中一種是經由粒線體所引發的內源性路徑 (Intrinsic pathway)，另外一種則是透過死亡受體 (Death receptor) 所引發的外源性路徑 (Extrinsic pathway) (Rossi & Gaidano, 2003)。

粒線體細胞凋亡路徑是細胞內部受損傷的主要訊息反應路徑之一。在內原性的細胞凋亡中，粒線體因為活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的增加，會釋放出細胞色素 C (Cytochrome C)，細胞色素 C 在去氧腺苷三磷酸 (Deoxyadenosine triphosphate, dATP) 存在的條件下，會與凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) 結合形成多聚體，並與 Caspase-9 結合形成凋亡小體，進而活化 Caspase-3，誘導細胞凋亡 (Rao et al., 2004)。

在外源性路徑中，Death Receptor 會與 Procaspase-8 結合，並活化 Caspase-8，進一步導致 Caspase-3 的活化，Caspase-3 會促進脫氧核糖核酸酶 (Deoxyribonuclease, DNase) 的活化，使 DNA 受到損傷形成小片段，並摧毀蛋白質，誘導細胞凋亡 (Rao et al., 2004)。

(四) 研究方法及步驟

4-1-1. 細胞培養

巨噬細胞 RAW 264.7 於食品工業研究所購得。細胞培養於含 10% 胎牛血清與 1% streptomycin and penicillin 之 DMEM 培養基，於 37 °C, 5% 二氧化碳之培養箱內培養，待細胞長滿後以 5×10^5 濃度分裝到 6 well 或 24 well 中，隔日進行後續的加藥試驗分析。

4-1-2. 藥物處理流程

將 RAW264.7 細胞培養於 24 well 或 6 well 中，加入已回溫至室溫的 PBS 清洗細胞兩次，再加入未含 10% FBS 之 DMEM 後，在各個 well 中分別加入 1 μ l / ml DMSO 做為控制組，以及 3, 10, 30, 50 μ M 的 1-NP 為實驗組，分別作用 6, 12, 24, 48 h 後，保留上清液於 -80 °C 冰箱，並使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1ml PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿。

4-2. 細胞存活分析 (MTT)

MTT 為一種黃色染劑，它會被活細胞所吸收，然後經由粒線體中的脫氫酵素 (succinate dehydrogenase) 還原形成藍色的 formazan，藉由吸光值的測量來評估藥物對細胞生長的影响，常用來當作檢測細胞存活與生長的指標。加藥前一天將 5×10^6 的細胞種於 24 well。待細胞貼壁後，移除 well 中的 medium，用 PBS 沖洗兩次。加入 0.5 % FBS 的 medium 後便開始加藥。

接著去除上清液，加入 100 μ l MTT，置入培養箱 2 小時後取出，再加入 100 μ l triton X，將藍色結晶溶解，最後利用 microplate reader 以 570nm 測吸光值，以對照組的吸光值為 100 %，實驗組與對照組的比值即為相對的細胞存活率。

4-3.細胞微小核試驗 (Micronucleus Assay ; MN)

將 5×10^5 的細胞種於 6 well，待 24 小時細胞貼壁後去除 DMEM，以 PBS 沖洗兩次後，加入 0.5 % FBS 的 DMEM 2 ml。再分別加入 2 μ g Cytochalasin B 及 1-NP (50 μ M、30 μ M、10 μ M、3 μ M) 作用 24 個小時。之後將細胞收集至 tube 中，離心 8 分鐘、1200 rpm 去除上清液，以 75 mM KCl 處理 1 分鐘後，離心 8 分鐘 1200 rpm 去除上清液，緩緩加入 7 ml 固定液 (methanol : acetic acid=3 : 1)，靜置處理 30 分鐘，離心 8 分鐘 1200 rpm 去除上清液，加入固定液 5ml 處理 5 分鐘，離心 8 分鐘 1200 rpm 去除上清液，再重複同一次步驟但固定液處理 3 分鐘，加入 0.5 ml 固定液，充分混合成懸浮液，將懸浮液滴在玻片上置於加熱板待玻片乾後，以 3 % Giemsa 染色 6 分鐘，並以一次水清洗後風乾一個晚上。每片玻片觀察 1000 個雙核細胞，分析其染色體變異情形。

4-4.reactive oxygen species (ROS) 測定

2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) 螢光染劑被用來測定細胞內活性氧化物 (ROS) 的含量。DCFH-DA 是一種穩定的非極性化合物，可自由通透細胞膜。當 DCFH-DA 進入細胞後，會被細胞內的酯酶水解，形成具有極性的 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH)，並滯留細胞內。細胞內的 ROS 與 DCFH 產生氧化還原反應形成 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)，以 450 ~ 490 nm 波長激發後，產生的綠色螢光可以被 510 ~ 550 nm 波長偵測出。如遇有 H₂O₂ 等自由基則會被氧化成為發前綠色螢光的 DCF，所發散的螢光則可反映出細胞內 ROS 的濃度。

實驗步驟：

將 5×10^4 的細胞種於 96 well，待 24 小時細胞貼壁後去除 DMEM，用 PBS 沖洗兩次後將舊有的 DMEM 清除乾淨，加入 100 μ l 無 FBS 的 DMEM。先依次加入不同濃度的 1-NP (50 μ M、30 μ M、10 μ M、3 μ M) 及 DMSO (對照組)，接著加入 2 μ l DCFH-DA 處理 1 小時後，置入培養箱中待 30 分鐘。

置入五合一多功能光譜儀測 480、530nm 的螢光。

4-5.一氧化氮測定

Nitric oxide (NO) 在以前總是被認為是一種空氣汙染的物質，是一種氧自由基會對細胞造成傷害，但是近年來相關文獻指出，人體內產生的 NO 在全身性的生理調節上扮演重要的角色，NO 是自由基，分子小、化性活潑、具親脂性、溶於水，且能在細胞間自由通透。NO 對身體而言是必要的，但過量的 NO 就會誘發細胞毒性及突變性。(Ohshima and Bartsch, 1994)。

實驗步驟:

將 5×10^5 的細胞種於 24 well，待 24 小時細胞貼壁後去除 DMEM，以 PBS 沖洗兩次後，加入無色的 DMEM。接著加入不同濃度的 1-NP (50 μ M、30 μ M、10 μ M、3 μ M) 置入培養箱中 24 小時，再抽取上清液 100 μ l 移至 96 well 中，加入 50 μ l 的 reagent A (Sulfanilamide 2g, H_3PO_4 11.6 ml, 溶於 200 ml ddH₂O) 後再加入 reagent B (N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 200 mg, 溶於 200 ml ddH₂O)，避光靜置 10 分鐘最後置入 microplate reader 測吸光值 550 nm。

4-6.鹼性彗星電泳法 (Comet assay)

第一層將 200 μ l 的 0.5 % Normal Melting Agarose (NMA) 覆蓋在玻片上。第二層將 75 μ l 的細胞液加入的 0.7 % Low Melting Agarose (LMA)，覆蓋在準備好的玻片。第三層是覆蓋上 75 μ l 的 0.7 % 的 LMA。細胞溶解在 Lysing solution 中 (2.5 M NaCl、10 mM Tris、100 mM EDTA、pH 10、1 % Triton-X 100 和 10 % DMSO、34.1 mM N-Lauroyl-Sarosine、200 mM NaOH)，至少一小時。玻片被安置在一個水平凝膠電泳槽，注入 Electrophoresis Buffer (300 mM NaOH、1 mM EDTA、pH > 13)。經過 20 min 等 dsDNA 轉變為 ssDNA，再將玻片放在電泳槽 (25 V/cm, 300 mA, 20 min)。以 Neutralization Buffer 沖洗並稍微浸泡，細胞用 EtBr 染色。用螢光顯微鏡分析玻片，以 400 X 的倍率數 40 個細胞。DNA migration 取決於 strand breaks 和 alkali labile sites，migration 的程度使用 image-analysis system 分析。DNA migration 的程度用 'OTM' 定義：相對量的 DNA 彗星尾巴乘以遷移距離中位數 (median migration distance) 統計分析是用 80 個細胞的 OTM 的平均每個樣品有兩個玻片，每片 40 個細胞。

4-7.Caspases 活性測定

RAW264.7 細胞經藥物處理後，使用 PBS 清洗細胞兩次，再加入 1 ml PBS，利用微量吸管反覆沖洗細胞，使其脫離培養皿，裝入 1.5 ml 離心管中，在

細胞中加入 50 μ l lysis buffer，均勻攪拌後置於冰上 10 min。加入 50 μ l 含 1% DTT 的 2X reaction buffer，均勻攪拌後加入 5 μ l substrate，均勻攪拌後置於 37°C 培養箱中 1 至 2 h。攪拌均勻後在黑盤 96 well 內加入每格 100 μ l 的細胞懸浮液，利用 Micro plate reader 以激發光螢光波長 400 nm 及發射光螢光波長 505 nm 讀取並分析結果 (Yu et al., 2012)。

4-8.統計方法

實驗數據皆以 Mean \pm standard deviation (SD) 表示，統計以 one-way ANOVA 進行分析，並以 Bonferroni's-test 事後檢定比較各組差異，分析結果若 p 小於 0.05，視為具有統計上的顯著意義。

(五) 結果

5-1. 在 RAW 264.7 細胞株中，1-NP 作用下細胞存活率呈濃度依賴性

及時間依存性降低細胞存活率

藉由 MTT 的方式進行 1-NP 以濃度依賴性與時間依存性的方式，觀察 1-NP 對 RAW264.7 細胞存活率之分析。MTT 實驗結果顯示，1-NP 會使細胞存活率呈現濃度依賴性及時間依存性方式降低細胞存活率 (圖二)。

5-2. RAW 264.7 中，1-NP 會對細胞造成 DNA 的損傷引發基因毒性的

產生

利用 Comet assay 的方式，進行 1-NP 以濃度依賴性引發基因毒性之分析。1-NP 隨著濃度的上升，可以觀察出細胞核拖尾的現象越來越嚴重，顯示 DNA 斷裂的片段越多 (圖三)。並以 Comet Assay IV 軟體計算出 tail moment 和 tail length，發現 1-NP 於 tail moment 和 tail length 呈隨著濃度依賴性有明顯上升現象 (圖三)。再以 Micronucleus Assay 的方式，評估 1-NP 以濃度依賴性的方式引發基因毒性之分析，也觀察到相同的現象。在 MN assay，1-NP 隨著處理的濃度上升引發的微核數與對照組相比有顯著之差異 (圖四)。因此，隨著 1-NP 濃度的提高，DNA 斷裂的片段越多損傷越嚴重，1-NP 所造成的基因毒性越高。

5-3. 1-NP 高濃度時會顯著引發細胞 ROS 的產生，進而引起細胞毒性

作用

利用偵測 ROS 的方式，進行 1-NP 產生 ROS 濃度的分析，結果顯示 1-NP 以濃度依賴性的方式造成 ROS 生成。因此，1-NP 會引發 RAW264.7 產生 ROS (圖五)。

5-4. 1-NP 對 RAW 264.7 並不引起 NO 細胞毒性的產生

利用 NO assay 的方式，刺激 RAW264.7 產生 NO 濃度。結果顯示，與對照組相較 1-NP 各個濃度並不會造成 NO 的生成。因此，1-NP 並不經由 NO 造成細胞毒性 (圖六)。

5-5. 1-NP 以濃度依存性影響 RAW 264.7 細胞產生 caspases-3、caspases-8 及 caspases-9

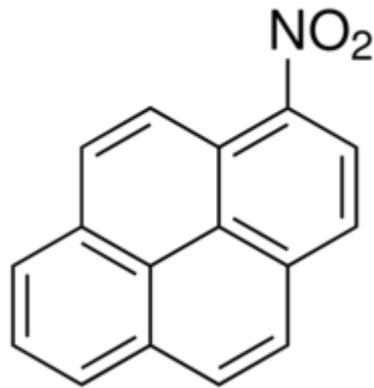
由圖六可以觀察到，當 1-NP 的濃度達到 50 μ M 時，與控制組相比，無論是 caspases-3，caspases-8 或 caspases-9 都有顯著的活化現象，並呈現濃度依存性 (圖七)。以上結果可以得知，1-NP 會誘發 RAW264.7 細胞產生濃度依存性的 caspases-3，caspases-8 及 caspases-9 的活化。

(六) 結論

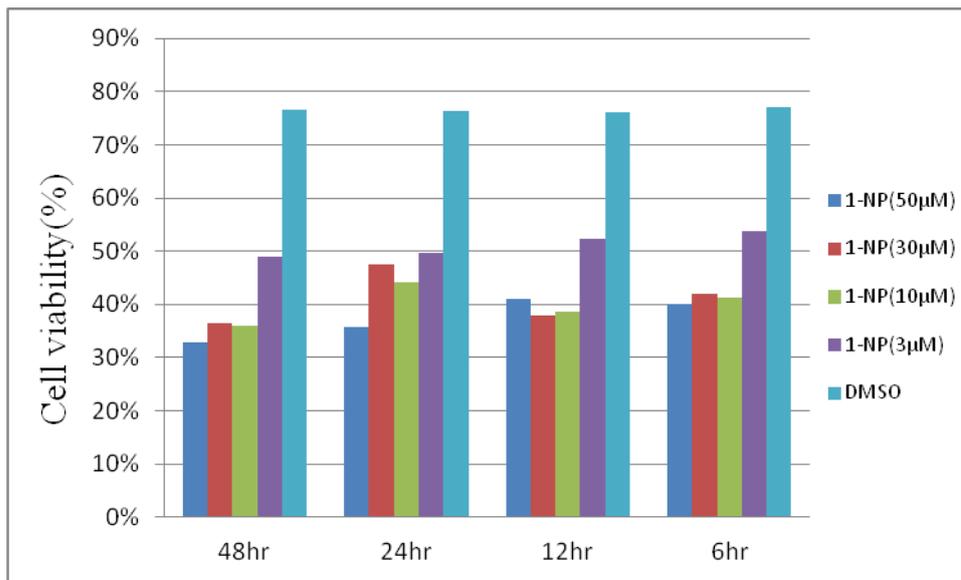
藉由此研究，能增進對於 1-NP 引發小鼠巨噬細胞株 (RAW264.7 cells) 死亡機轉的認識，首先由 MTT 發現以 1-NP 處理 RAW264.7 後，將呈時間依存性及濃度依賴性的關係，並引發的細胞存活度下降 (圖二)，接著利用彗星實驗 (Comet assay) 與微小核實驗 (micronucleus, MN)，觀察基因的損傷 (圖三、四)，且濃度越高 DNA 斷裂片段越多 (圖三)，因此，TEGDMA 可經由基因毒性的方式引發細胞死亡。另外，ROS 的產生則是隨著 1-NP 濃度越高，所造成細胞毒性的影響也將越顯著 (圖五)。而 1-NP 對於 NO 的產生並無顯著影響 (圖六)，所以並不造成細胞毒性作用。最後在本研究中，以 1-NP 處理 RAW264.7 細胞後，觀察其 caspases family 的表現，結果發現，1-NP 以濃度依存性的方式誘發 RAW264.7 細胞產生 caspases-3、caspases-8 及 caspases-9 的活化 (圖七)，透過此結果可以得知，1-NP 能夠經由兩種不同的路徑促使 caspases-3 活化而導致細胞傷害。

往後期待能有更深入的瞭解 1-NP 在 RAW264.7 上的作用機轉及機制，並發表論文於國際知名期刊，以提升台灣在全世界的環境毒物研究之學術地位。最後，期望未來能發現有效抑制 1-NP 機轉及機制的衍生物，以及開發得到有效抑制其之藥物結構。

(七) 圖表

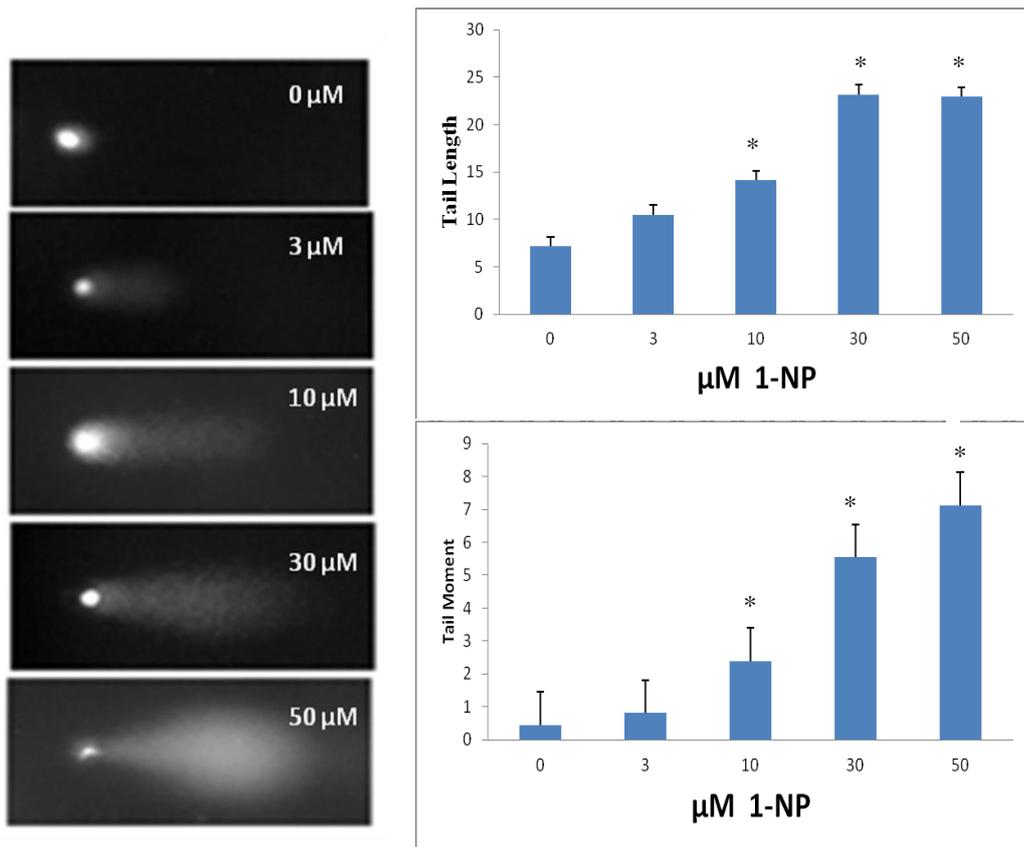


圖一、1-Nitropyrene 化學結構式



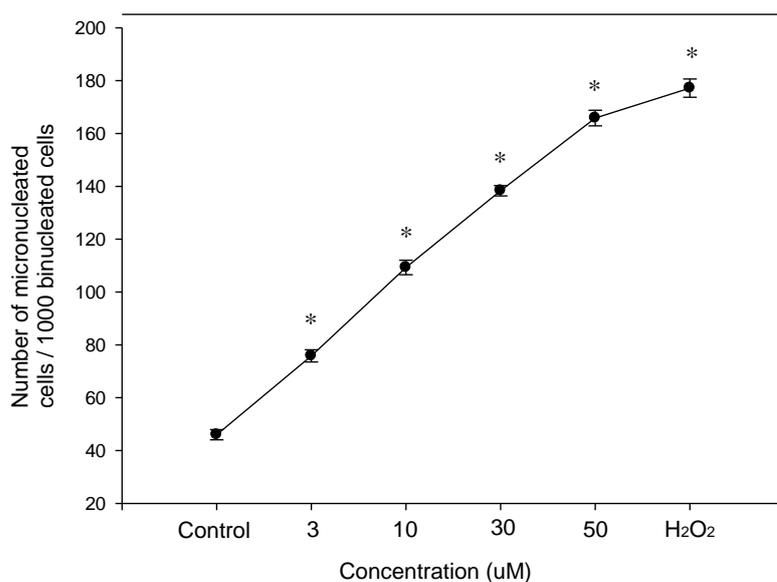
圖二、在 RAW 264.7 細胞株中，1-NP 會造成細胞存活率下降

RAW264.7 加入 50 μM、30μM、10μM、3μM 不同濃度的 1-NP 及 DMSO 後，分別置入培養箱中處理 6、12、24 和 48 小時。並利用 Micro plate reader 550 nm 檢測細胞毒性。



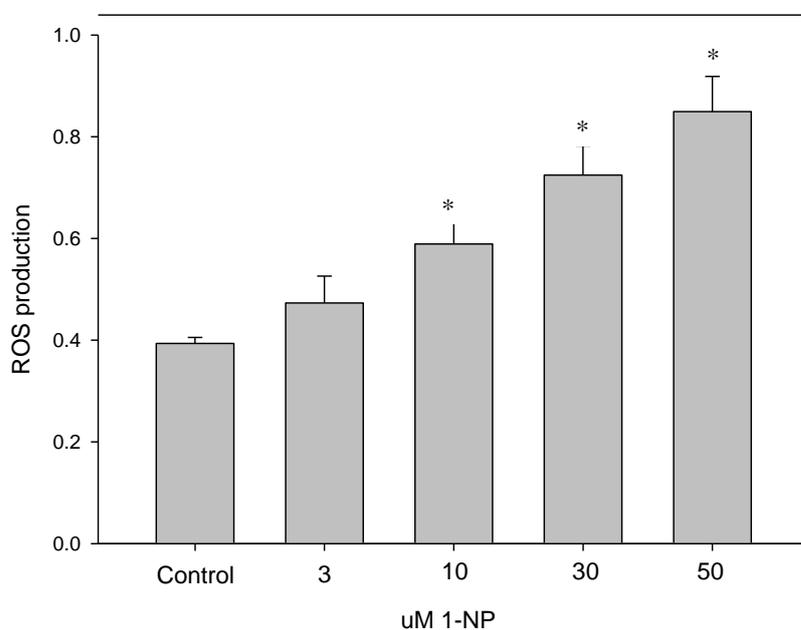
圖三、1-NP 以濃度依存性影響 RAW264.7 細胞產生彗尾範圍及彗尾長度的提高

RAW264.7 加入 50 μM 、30 μM 、10 μM 、3 μM 不同濃度的 1-NP 處理 24 小時後，將細胞與膠混和均勻，安置在水平凝膠電泳槽進行電泳 20 分鐘，再以 EtBr 染色。染色完畢即可使用螢光顯微鏡分析，並以 400X 的倍率每片 sample 取 40 個細胞利用軟體分析細胞 DNA 之 tail moment。



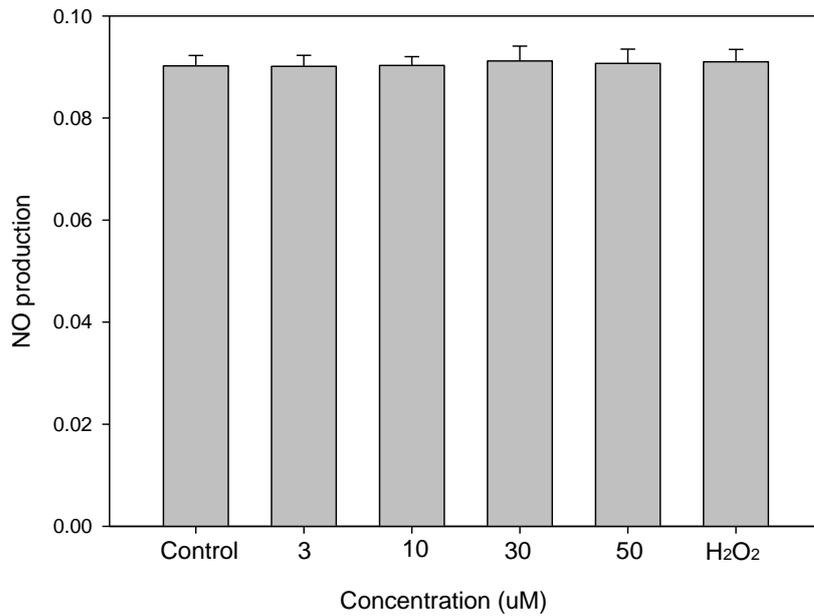
圖四、1-NP 以濃度依存性影響 RAW264.7 細胞產生微小核

RAW264.7 加入 Cytochalasin B、H₂O₂ 及 50 μM、30μM、10μM、3μM 不同濃度的 1-NP 處理 24 小時後，將細胞固定後滴在玻片上，待玻片乾以 Giemsa 染色，並以一次水清洗後風乾一個晚上，分析觀察 1000 個細胞。



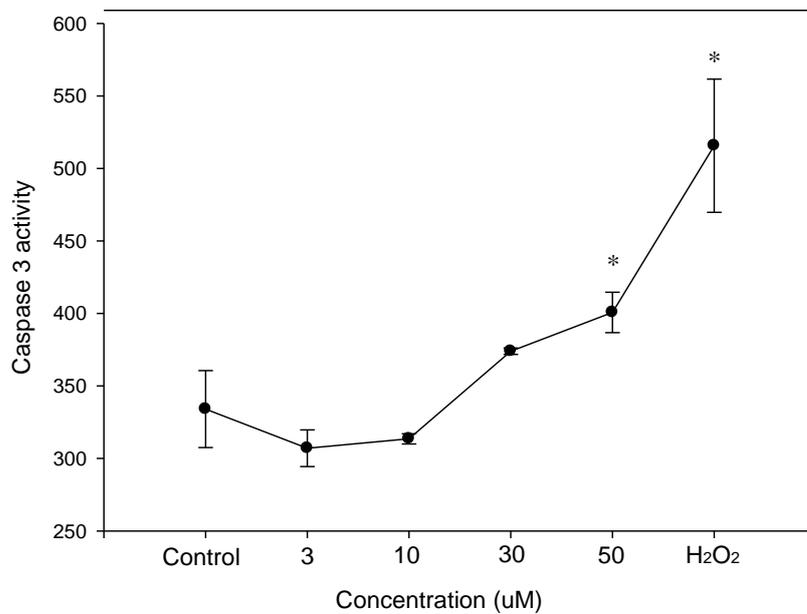
圖五、1-NP 以濃度依存性影響 RAW264.7 細胞產生 ROS

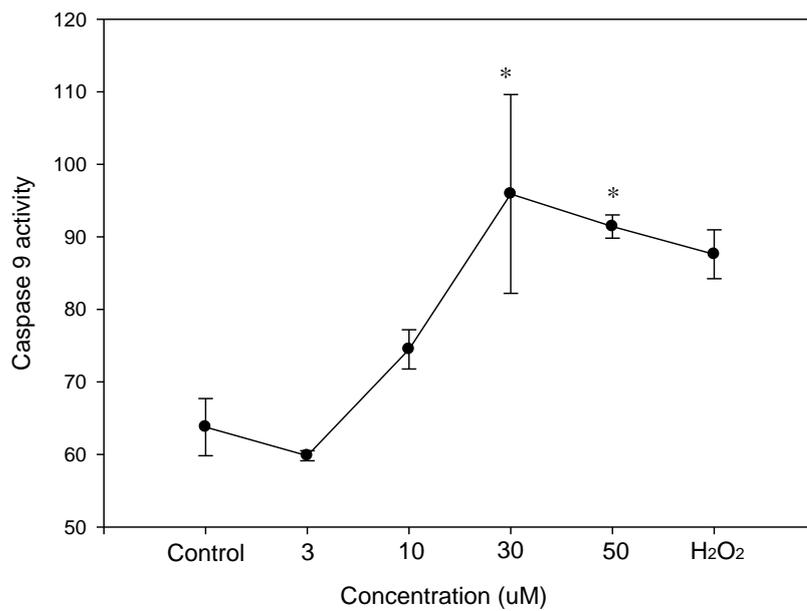
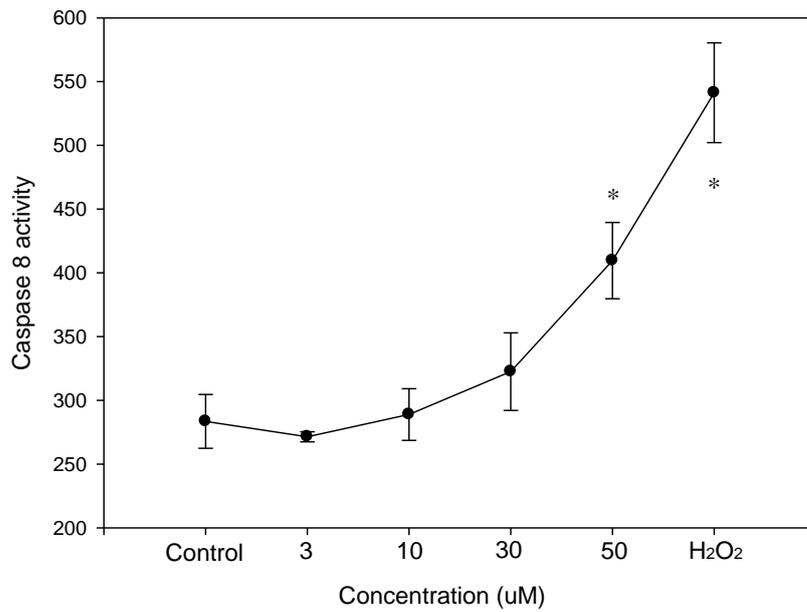
加入 DCFHDA 處理 1 小時及 50 μM、30μM、10μM、3μM 不同濃度的 1-NP 處理 24 小時後，置入五合一多功能 microplate reader 檢測螢光。



圖六、1-NP 並不會影響 RAW264.7 細胞造成 NO 的濃度差異

RAW264.7 加入 H₂O₂ 及 50 μM、30μM、10μM、3μM 不同濃度的 1-NP 處理 24 小時後，抽取上清液至 96 well 中，再分別加入 reagent A 以及 reagent B，經避光靜置 10 分鐘，最後置入 microplate reader 檢測吸光值。





圖七、1-NP 以濃度依存性影響 RAW264.7 細胞產生 caspases-3、caspases-8 及 caspases-9

RAW264.7 加入 50 μ M、30 μ M、10 μ M、3 μ M 不同濃度的 1-NP 處理 24 小時後，收取細胞並進行 caspase activation assay。結果顯示，TEGDMA 以濃度依存性的方式影響 RAW264.7 產生 caspases-3、caspases-8 及 caspases-9 的活化。

(八) 參考文獻

- Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the Marseilles area (South of France): concentrations and sources. *Sci. Total Environ.* 2007; 384: 280–292.
- Andrew C, Ma^Âria D, Michael F, Martina S, Helena P, Susan D, Laurence F, Mihalís P, KatarõBna R^Â, and Nicholas V. Comet Assay in Human Biomonitoring Studies: Reliability, Validation, and Applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 1997; 30: 139-146.
- Andrew RC, Victoria LD, Ma^Ária D, Gayle K, udolf S. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research Mutation Research.* 1997; 375: 183–193.
- Chakraborti T, Ghosh SK, Michael JR, Batabyal SK, Chakraborti S. Targets of oxidative stress in cardiovascular system. *Mol Cell Biochem.* 1998; 187: 1-10.
- Chang KF, Fang GC, Chen JC, Wu YS. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Asia: a review from 1999 to 2004. *Environ. Pollut.* 2006; 142: 388–396.
- Curnutte JT. Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993; 67: S2–S15.
- Dinauer MC, Orkin SH. Chronic granulomatous disease. *Ann Rev Med.* 1992; 43: 117–124.
- Park EJ, Park K. Induction of pro-inflammatory signals by 1-nitropyrene in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters.* 2009; 184: 126–133.
- Frenkel K, Donahue JM, and Banjeree S. benzo[a]pyrene-induced oxidative DNA damage: a possible mechanism for promotion by complete carcinogens. In: Cerutti P, Fridovich I, and McCord J. (ed.) *Oxy-radicals in Molecular Biology Pathology, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Bew Series, Alan R. Liss, New York.* 1998; 509-524.
- Gonzalez de Mejia E, Loarca-Pina G, Ramos-Gomez M. Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene. *Mutat. Res.* 1997; 389: 219–226.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.* 1993; 307: 108-112.
- Josephy PD. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis. In: *Molecular Toxicology, Oxford University Press, New York.* 1997; 315-351.

- Kim HJ, Kim TH, Lee SY, Lee DH, Kim SI, Pfeifer GP, Kim SK, Lee CS. DNA sequence analysis of 1-nitropyrene-4,5-oxide and 1-nitropyrene-9,10-oxide induced mutations in the hprt gene of Chinese hamster ovary cells. *Molecules and Cells*. 2005; 19: 114–123.
- Kim YD, Ko YJ, Kawamoto T, Kim H. The effects of 1-nitropyrene on oxidative DNA damage and expression of DNA repair enzymes. *J. Occup. Health*. 2005; 47(3): 261–266.
- Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*. 2010; 31: 2964-2975.
- Landvik NE, Gorria M, Arlt VM, Asare N, Solhaug A, Lagadic-Gossmann D, Holme JA. Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects. *Toxicology*. 2007; 231: 159–174.
- Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J Androl*. 1994; 15: 255-265.
- Leadon SA, Stampfer MR, and Bartley J. Production of oxidative DNA damage during the metabolic activation of benzo[a]pyrene in human mammary epithelial cells correlates with cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 85: 4365-4368.
- Lee H, Wang L, Shih JF. Mutagenicity of particulates from the laboratory combustion of plastics. *Mutat. Res*. 1995; 346(3): 135–144.
- Mariona T, Marta M, Laura T, Anna G. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*. 2010; 705: 60–67.
- Mauthe RJ, Cook VM, Coffing SL, and Baird WM. Exposure of mammalian cell cultures to benzo[a]pyrene and light results in oxidative DNA damage as measured by 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 33-137.
- Moon HB, Kannan K, Lee SJ, Ok G. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban and a suburban area of Korea from 2002 to 2004. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 2006; 51(4): 494–502.
- Murahashi T, Kisu R, Kakimoto H, Toriba A, Hayakawa K. 2-Nitrofluoranthene, 1-, 2- and 4-nitropyrenes and 6-nitrochrysene in diesel-engine exhaust and airborne particules. *J Health Sci*. 1999; 45: 244–250.

- Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*. 2007; 121(11): 2357-63.
- Nakanishi Y, Bai F, Inoue K, Takayama K, Pei XH, Harada T, Izumi M, Kimotsuki K, Tokiwa H, Hara N. Polychlorinated biphenyls promote 1-nitropyrene-induced lung tumorigenesis without the induction of K-ras gene mutation in A/J mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen*. 2001; 21(6): 395–403.
- Ohshima , Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*. 1994; 323: 253-64.
- Paya M, Halliwell B, Hoult JR. Peroxyl radical scavenging by a series of coumarins. *Free Radic. Res*. 1992; 17: 293-298.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death & Differentiation*. 2004; 11: 372-380.
- Rosenkranz HS, Mermelstein R. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res*. 1983; 114: 217–267.
- Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*. 2003; 88: 212-218.
- Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *British Medical Bulletin*. 1997; 53: 478-490.
- Vallyathan V, Shi X, Castranova V. Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1998; 106: 1151-5.
- Watt DL, Utzat CD, Hilario P, Basu AK. Mutagenicity of the 1-nitropyrene-DNA adduct N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol*. 2007; 20(11): 1658–1664.
- Wichmann HE. Diesel exhaust particles. *Inhal. Toxicol*. 2007; 19: 241–244.
- Yang JL, Maher VM, and McCormick JJ. Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of (+)-7b, 8a-dihydroxy-9a, 10a-epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo(a)pyrene replicates in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 3787-3791.
- Yang JL, Maher VM, and McCormick JJ. Kinds and spectrum of mutations induced by 1-nitropyrene adducts during plasmid replication in human cells. *Mol Cell Biol*. 1988; 8: 3364-3372.
- Yu FS, Huang AC, Yang JS, Yu CS, Lu CC, Chiang JH, Chiu CF, Chung JG. Safrole

induces cell death in human tongue squamous cancer SCC-4 cells through mitochondria-dependent caspase activation cascade apoptotic signaling pathways. *Environmental Toxicology*. 2012; 7: 433-444.