

## 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討重金屬氯化鎳誘發肺上皮細胞株上皮-間質相互轉換  
(epithelial-mesenchymal transition; EMT)表現機制及  
開發反轉機轉與減緩肺癌惡化之關係(第3年)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 99-2314-B-040-012-MY3

執行期間：101年08月01日至102年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：柯俊良

計畫參與人員：博士後研究：湯曉君

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 102年10月18日

中文摘要：細胞進行上皮-間質型轉換過程 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肺纖維化和腫瘤轉移前的重要程序，在此過程中，細胞與細胞間結合的標記蛋白 E-cadherin 會減少，間質型標記蛋白 fibronectin 的表現會增加，並且許多不同的訊息傳遞路徑參與其中。已知鎳化合物能夠造成肺部癌化以及對健康產生不良影響，然而目前仍不清楚鎳是否會誘導細胞進行上皮-間質轉換過程。我們的研究主要探討鎳是否誘發人類支氣管上皮細胞產生上皮-間質轉換現象以及相關基因表現，並且釐清氯化鎳啟動細胞進行上皮-間質轉換之可能分子機制。首先將 BEAS-2B 細胞暴露於鎳化合物，運用 RT-PCR 和西方墨點法觀察 E-cadherin 和 fibronectin 的表現量，觀察到氯化鎳誘導 E-cadherin 減少以及 fibronectin 增加，造成細胞產生上皮-間質轉換的現象。ROS 抑制劑 N-Acetyl Cysteine (NAC) 能夠抑制鎳所誘導的 EMT 和 HIF-1 $\alpha$  表現，而 DNA 甲基轉移酶 (DNMT) 抑制劑 5-Aza-dC 可回復 E-cadherin 表現。運用甲基化特異性聚合酶連鎖反應、定量即時甲基化特異性聚合酶連鎖反應和亞硫酸氫鈉定序法檢測鎳誘導的 E-cadherin 啟動子甲基化情形，發現鎳誘導透過產生 ROS 造成 E-cadherin 啟動子甲基化而降低 E-cadherin 的表現。綜合實驗結果得知，氯化鎳會誘導細胞進行上皮-間質型轉換，這可能參與鎳所造成的組織纖維化和細胞癌化的過程。

中文關鍵詞：氯化鎳、上皮-間質型態轉型、活性氧化物和啟動子甲基化

英文摘要：EMT is considered a critical event in the pathogenesis of lung fibrosis and tumor metastasis. During EMT, the expression of differentiation markers switches from cell-cell junction proteins such as E-cadherin to mesenchymal markers such as fibronectin. While Ni-containing compounds have been shown to be associated with lung carcinogenesis, the role of Ni in the EMT process in bronchial epithelial cells is not clear. The aim of this study is to examine whether Ni contributes to EMT in human bronchial epithelial cells. We also attempted to clarify the mechanisms involved in NiCl<sub>2</sub>-induced EMT. Our results showed that NiCl<sub>2</sub> induces EMT phenotype marker alterations such as up-regulation of fibronectin and down-regulation of E-cadherin. In addition, the potent antioxidant N-Acetyl cysteine (NAC) blocked EMT and expression of HIF-1 $\alpha$  induced by NiCl<sub>2</sub>, while

DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor 5-aza-2' - deoxycytidine (5-Aza-dC) restored the down-regulation of E-cadherin induced by NiCl<sub>2</sub>. Promoter hypermethylation of E-cadherin, determined by quantitative real-time methyl-specific polymerase chain reaction (QMSP) and bisulfite sequencing, was also induced by NiCl<sub>2</sub>. These results shed new light on the contribution of NiCl<sub>2</sub> to carcinogenesis. Specifically, NiCl<sub>2</sub> induces down-regulation of E-cadherin by promoter hypermethylation via reactive oxygen species (ROS) generation. This study demonstrates for the first time that Ni induces EMT in bronchial epithelial cells.

英文關鍵詞： nickel chloride, epithelial-mesenchymal transition (EMT), reactive oxygen species (ROS) and promoter methylation

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討重金屬氯化鎳誘發肺上皮細胞株上皮-間質相互轉換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)表現機制及開發反轉機轉與減緩肺癌惡化之關係

The mechanisms of nickel chloride induce epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelial cells and develop the reversal mechanisms to alleviate malignant lung cancer

計畫編號：99-2314-B-040 -012 -MY3

執行期限：99年8月1日至102年7月31日

主持人：柯俊良 教授 中山醫學大學 醫學研究所

## 中文摘要

細胞進行上皮-間質型轉換過程 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肺纖維化和腫瘤轉移前的重要程序，在此過程中，細胞與細胞間結合的標記蛋白 E-cadherin 會減少，間質型標記蛋白 fibronectin 的表現會增加，並且許多不同的訊息傳遞路徑參與其中。已知鎳化合物能夠造成肺部癌化以及對健康產生不良影響，然而目前仍不清楚鎳是否會誘導細胞進行上皮-間質轉換過程。我們的研究主要探討鎳是否誘發人類支氣管上皮細胞產生上皮-間質轉換現象以及相關基因表現，並且釐清氯化鎳啟動細胞進行上皮-間質轉換之可能分子機制。首先將 BEAS-2B 細胞暴露於鎳化合物，運用 RT-PCR 和西方墨點法觀察 E-cadherin 和 fibronectin 的表現量，觀察到氯化鎳誘導 E-cadherin 減少以及 fibronectin 增加，造成細胞產生上皮-間質轉換的現象。ROS 抑制劑 N-Acetyl Cysteine (NAC) 能夠抑制鎳所誘導的 EMT 和 HIF-1 $\alpha$  表現，而 DNA 甲基轉移酶(DNMT)抑制劑 5-Aza-dC 可回復 E-cadherin 表現。運用甲基化特异性聚合酶連鎖反應、定量即時甲基化特异性聚合酶連鎖反應和亞硫酸氫鈉定序法檢測鎳誘導的 E-cadherin 啟動子甲基化情形，發現鎳誘導透過產生 ROS 造成 E-cadherin 啟動子甲基化而降低 E-cadherin 的表現。綜合實驗結果得知，氯化鎳會誘導細胞進行上皮-間質型轉換，這可能參與鎳所造成的組織纖維化和細胞癌化的過程。

**關鍵詞：**氯化鎳、上皮-間質型態轉型、活性氧化物和啟動子甲基化

## 英文摘要

EMT is considered a critical event in the pathogenesis of lung fibrosis and tumor metastasis. During EMT, the expression of differentiation markers switches from cell-cell junction proteins such as E-cadherin to mesenchymal markers such as fibronectin. While Ni-containing compounds have been shown to be associated with lung carcinogenesis, the role of Ni in the EMT process in bronchial epithelial cells is not clear. The aim of this study is to examine whether Ni contributes to EMT in human bronchial epithelial cells. We also attempted to clarify the mechanisms involved in NiCl<sub>2</sub>-induced EMT. Our results showed that NiCl<sub>2</sub> induces EMT phenotype marker alterations such as up-regulation of fibronectin and down-regulation of E-cadherin. In addition, the potent antioxidant N-Acetyl cysteine (NAC) blocked EMT and expression of HIF-1 $\alpha$  induced by NiCl<sub>2</sub>, while DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) restored the down-regulation of E-cadherin induced by NiCl<sub>2</sub>. Promoter hypermethylation of E-cadherin, determined by quantitative real-time methyl-specific polymerase chain reaction (QMSP) and bisulfite sequencing, was also induced by NiCl<sub>2</sub>. These results shed new light on the

contribution of NiCl<sub>2</sub> to carcinogenesis. Specifically, NiCl<sub>2</sub> induces down-regulation of E-cadherin by promoter hypermethylation via reactive oxygen species (ROS) generation. This study demonstrates for the first time that Ni induces EMT in bronchial epithelial cells.

**Key words:** nickel chloride, epithelial-mesenchymal transition (EMT), reactive oxygen species (ROS) and promoter methylation

## 前言、研究目的和文獻探討

鎳金屬與鎳化合物廣泛被運用於現代的社會工業中，舉凡電鍍業、鎳鎘電池製造業、鎳的精煉業以及錢幣製造業等等，另外，香菸和石油燃燒所產生的危害物質中也包含著鎳。國衛院一項研究指出，台灣中部彰化地區的電鍍工廠密集度高，針對附近居民採集尿液進行分析，發現鄰近工廠的居民暴露鎳的含量明顯地高於一般住宅區的民眾 [1]。國際癌症研究中心 (International Agency for Research on Cancer; IARC) 將鎳金屬歸類為 2B 可能致癌性物，而鎳化合物則是第一類致癌物 [2]。美國環保署 (Environmental Protection Agency, EPA) 以及國家毒物計畫 (National Toxicology Program; NTP) 也指出，含有鎳的粉塵與次硫化鎳 (nickel sulfide, Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>) 具有致癌性 [3]。吸入任一種鎳化合物，皆會刺激動物呼吸道、引起化學性肺炎、肺癌以及不同程度的肺部細胞損傷 [4]。

職業暴露到鎳的員工為發病的高危險群。先前研究指出，重金屬鎳對細胞所造成的毒性與肺纖維化有關 [5, 6]。英國流病學大師 Peto 針對威爾斯地區的鎳礦工人進行長時間死亡率分析，發現這些投入於精煉工廠的勞工，爾後得到肺癌 (lung cancer) 與鼻癌 (nasal cancer) 的比例相當高 [7]。此外，過去文獻也指出 [8]，職業性暴露鎳的勞工大多屬於提煉業或電鍍業較多，而一般民眾則是在未知的情況下，暴露到環境中的鎳，例如工業區的空氣中含有鎳的懸浮微粒比農業區多。暴露鎳的時間越長或濃度越高與肺癌的罹患率有相當密切的關聯性，除此之外，國衛院李輝教授的研究也指出，在肺癌病患的組織中發現有較多的重金屬鎳堆積 [9]。

鎳離子會攻擊異染色質，使染色體受到損傷。鎳離子和 histone H1 蛋白結合，並且增強染色體的濃縮以及增加相鄰區域 DNA 的甲基化，這些表觀遺傳 (epigenetic) 的改變結果造成腫瘤抑癌基因 (tumor suppressor gene) 在遺傳過程中不表現 [10]。透過三價或二價鎳化合物的調控機制，鎳離子和異染色質的 histone 蛋白結合，同時會產生許多過氧化物。隨後這些過氧化物會與 DNA 交互作用，使得 DNA 鹼基毀損、DNA 斷裂以及 DNA-protein crosslinks。在先前體外模式的突變分析中證實，鎳化合物並無法誘使點突變，因此，直接藉由鎳離子產生過氧化物來造成遺傳變異的過程，在 in vivo 模式裡可能不太有意義。過氧化物所造成 DNA 損傷，或許只顯著地侷限在異染色質區域中缺乏活性的基因 [11]。

原本沒有爬行能力的上皮細胞會經由細胞-間質型態轉換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 過程，使細胞轉變成為具有爬行能力。EMT 最早是發生在胚胎發育時期，隨後的器官生成時期也有 EMT 的參與，上皮與內皮細胞 (尤其是鱗狀上皮細胞) 會透過細胞激素而轉變成為纖維母細胞。當成人組織反覆地受損時，細胞激素同樣會透過相同機制，致使大量的纖維母細胞生成 [12-14]。在一些癌細胞中，也可觀察到有 EMT 的發生，最終細胞型態會變得具有侵襲和轉移能力 [15, 16]；這說明了上皮腫瘤細胞可重複利用正常存在於纖維母細胞形成過程時的 EMT 分子機制，讓細胞變得會移行 (migration) [17]。

Epithelial-cadherin，簡稱 E-cadherin，為分子量 120 kDa 的跨模 (transmembrane) 醴化蛋白，基因的位置位於人類第 16 對染色體長臂 22.1；一般在正常上皮細胞上可觀察到 E-cadherin 的表現，是構成細胞與細胞間之接縫的主要蛋白質 [18]。除此之外，E-cadherin 也參與細胞與細胞間交互作用，

如 junction complex 的形成以及細胞的極性之決定等，再者，在胚胎的發育、細胞的分化、組織修補時之細胞移行，也都需要 E-cadherin 基因的調控。當 E-cadherin 功能喪失時，細胞便失去接觸性抑制 (contact inhibition) 的特性，造成細胞分裂增生並且改變細胞分化的狀態 [19]。因此，上皮細胞之 E-cadherin 失去其應有的功能時，即被認為應是腫瘤細胞發生的開始。E-cadherin 表現量的改變是 EMT 的典型上皮細胞標記，E-cadherin 在上皮細胞中會大量表現，當在胚胎發育、組織纖維化和癌症過程中產生 EMT 時，E-cadherin 的表現量會減少 [20, 21]。當 E-cadherin 功能缺失，即可誘使 EMT 發生 [12, 22]。

腫瘤的轉移 (metastasis)，經常是癌症發展過程中病程惡化的主因。細胞轉移前重要的發展過程為上皮型細胞轉化成間質型細胞，細胞與細胞之間的游離可以透過 EMT 來造成。影響細胞的附著能力及細胞彼此間的鍵結蛋白有 E-cadherin、fibronectin、laminin 和 proteoglycan 等，fibronectin 是細胞組織間隙中一個非常重要的蛋白，細胞的固著、分化、生長或是癌細胞的移行都與 fibronectin 有密切關聯性。而在 EMT 的過程中，會發生細胞間黏合的能力降低以及細胞失去極性 (apical-basal polarity)；此外，細胞的型態也會改變，細胞的紡錘體呈現纖維狀態，導致細胞變成單層且細長狀 [23]。EMT 這個過程啟動時，會有一些基因特徵可見，例如 E-cadherin 的基因表現會降低；fibronectin 和 vimentin 的基因表現會增加等，使得細胞的行為傾向於易侵襲 (invasion) 以及可移行的狀態 [24]。誘發 EMT 的因子相當多樣化，包括：TGF- $\beta$ -receptor tyrosine kinase/Ras、表皮細胞生長因子 (epidermal growth factor, EGF)、肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、類胰島素生長因子 (Insulin-like growth factor, IGF)、Wnt 和 Notch 等，都會刺激 EMT 途徑活化 [25]。然而，也有一些轉錄因子可以誘使 EMT 的發生，例如：zinc-finger-containing Snail family (Snai-1/Snail and Snai-2/Slug)、ZEB family (ZEB-1/deltaEF1 and ZEB-2/SIP1) 以及 basic helix-loop-helix (bHLH) 因子 (E2A、Id2、Id3 and Twist) 等，這些轉錄因子都會抑制 E-cadherin 基因的表現，而啟動了 EMT 的活化 [22, 26]。

從臨床結果得知，第一期與第二期的非小細胞肺癌病患可能發生微量轉移 (micrometastasis, MMs) [27]，致使手術切除治療和預後較差。而細胞進行上皮-間質轉換過程是肺纖維化和腫瘤轉移前的重要程序。鎳離子誘使肺上皮細胞產生發炎反應，引發肺纖維化；另外，纖維化也與 fibronectin 的增加具有相關性。喪失 E-cadherin 功能是細胞進行上皮-間質轉換過程的重要特徵之一，可影響細胞與細胞間的交互作用，並且改變細胞的型態，最後引起細胞轉移現象的發生。鎳化合物已經被國際癌症中心歸類為人類致癌物，並且鎳化合物會誘使細胞產生活性氧化物種 (reactive oxygen species, ROS)、活化 NF- $\kappa$ B 以及可以增加細胞的 LIP，這些因子也都會參與細胞進行上皮-間質轉換的過程。然而鎳是否誘導細胞進行上皮-間質轉換，引發肺纖維化；或是鎳在細胞癌化過程中，誘導細胞進行上皮-間質轉換，造成剛形成的癌細胞即具有轉移能力，目前仍未被探討。因此，我們主要闡釋氯化鎳是否誘發肺支氣管上皮細胞進行上皮-間質轉換的現象，造成上皮型標記蛋白 E-cadherin 表現下降，間質型標記蛋白 Fibronectin 表現增加。此外，運用不同種的抑制劑或 RNA 干擾系統 (RNA interference) 進一步釐清氯化鎳啟動細胞上皮-間質轉換之可能途徑及訊息傳遞。

## 結果與討論

### 一、鎳誘使 BEAS-2B 細胞發生 EMT 現象

鎳可以使得正常細胞纖維化以及能夠引發細胞轉型 [5, 6, 28]。也已經證明鎳以及鎳化合物具有造成細胞癌化的能力 [2]; [3]。另外，EMT 在細胞的纖維化與癌細胞的轉移扮演著重要的角色。所以，我們研究的主要目的為探討鎳是否造成細胞進行上皮-間質轉換，致使細胞的型態轉變。我們選用經過 Ad12SV40 轉型過的人類支氣管上皮細胞株 BEAS-2B 細胞來進行實驗，釐清上皮細胞在受到鎳的刺

激情況下，所引發的纖維化或癌化過程中是否有EMT的參與，最終導致所形成的細胞可能具有移行及侵襲的能力。

首先將BEAS-2B細胞經由不同種類的鎳化合物：氯化鎳 (0、0.25和0.5 mM)和硫酸鎳(0、0.25、0.5和1 mM)處理72小時，收集細胞的蛋白質，運用西方墨點法(Western blot)進行分析。隨著鎳化合物濃度的上升，細胞的上皮型標記蛋白(epithelial marker protein) E-cadherin表現量隨之減少；而間質型標記蛋白 (mesenchymal marker protein) fibronectin的表現量有增加的趨勢 (Fig. 1A和1B)。另外，細胞經由亞砷酸鈉處理亦可誘導細胞產生EMT現象(Fig. 1C)。

運用螢光免液染色法來觀察E-cadherin的表現及分佈，並且比較細胞型態是否發生變化。不同濃度的氯化鎳 (0、0.25、0.5 mM) 處理BEAS-2B細胞72小時，加入E-cadherin抗體與細胞進行雜交作用，再以含有螢光的抗體辨識E-cadherin，最後以倒立型共軛焦雷射掃描顯微鏡觀察。我們觀察到在控制組細胞中，E-cadherin表現於細胞膜，細胞間的E-cadherin會形成網狀結構，細胞的型態較圓；當氯化鎳處理過的BEAS-2B細胞，其分佈在細胞膜的E-cadherin明顯變少，細胞型態變得較細長，類似纖維母細胞 (fibroblast) 的細胞型態 (Fig. 1D)。欲進一步了解鎳化合物在EMT中所扮演的角色，我們選用氯化鎳進行後續實驗。

## 二、氯化鎳減少E-cadherin mRNA表現以及減少不同肺癌細胞E-cadherin表現

接著我們觀察氯化鎳是否影響EMT生物標記的mRNA表現。將不同濃度的氯化鎳 (0、0.25、0.5 mM) 處理BEAS-2B細胞48小時，收取細胞的RNA進行RT-PCR分析，我們發現細胞的E-cadherin mRNA表現量會隨著氯化鎳的濃度增加而減少，Fibronectin的mRNA表現量則不受影響 (Fig. 2A)。此外，我們在real-time PCR再次證實，E-cadherin mRNA表現量隨著氯化鎳處理的濃度而遞減 (Fig. 2B)。這些結果意味著E-cadherin的表現量在mRNA層面已受到氯化鎳的影響。

由於一般重金屬化合物是長時間低濃度暴露於人體，因此，為了模擬人體實際的生理狀況，我們將 BEAS-2B 細胞長時間暴露在較低濃度的氯化鎳 (0.1 mM)中，觀察氯化鎳是否能夠造成細胞產生EMT的現象。分別收集細胞不同時間點 (6天和9天) 的蛋白質和RNA，利用western blot以及RT-PCR分析。可以看到，相較於不同時間點的控制組，較低濃度氯化鎳處理的BEAS-2B細胞，其E-cadherin的mRNA和蛋白質表現量都會明顯地隨著時間逐漸變少，而fibronectin的mRNA和蛋白質表現量則有慢慢地增多的趨勢 (Fig. 2C和2D)。所以，這個結果告訴我們，BEAS-2B細胞不論是短時間處理較高濃度的氯化鎳或是長時間暴露於低濃度的氯化鎳，氯化鎳皆能誘使細胞進行EMT，包含E-cadherin減少以及fibronectin增加。

有趣的是，將多種肺癌細胞A549、CL1-0和H1355處理氯化鎳，同樣也發現到細胞的E-cadherin表現量下降 (Fig. 2E)。另外，我們分析不同細胞株 (包含BEAS-2B、A549、CL1-0、H1299和H1355細胞) 原本E-cadherin的表現量，發現H1299和H1355細胞的E-cadherin相較表現量低 (Fig. 2F)。

## 三、ROS參與氯化鎳所誘導的EMT

鎳可誘導細胞產生大量的ROS [29]。過多的ROS也會減少E-cadherin的表現量，而參與EMT的調控機制 [30, 31]。因此，我們進一步釐清氯化鎳是否透過ROS抑制E-cadherin表現。運用不同抗氧化劑或ROS scavengers (包含NAC: antioxidant; Tiron: superoxide anion scavenger; SOD: superoxide dismutase; allopurinol: xanthine oxidase inhibitor; rotenone: mitochondria respiratory chain inhibitor) 與氯化鎳共同處理細胞，Western blot的分析結果指出，NAC、Tiron和SOD都可破壞鎳化合物所誘導的EMT現象，然而NAC抑制fibronectin和回覆E-cadherin表現效果最明顯 (Fig. 3A)。進一步以NAC和不同

濃度的氯化鎳共同處理 BEAS-2B 細胞，E-cadherin 蛋白暴露於氯化鎳所產生的減少幅度變小，而間質型標記蛋白 fibronectin 的增加幅度也變少 (Fig. 3B)。綜合上述的實驗結果，說明了氯化鎳透過 ROS 促使細胞進行 EMT。

人類肺腺癌細胞株 A549 細胞內的游離鐵增加時，而誘導細胞進行 EMT [32]。另外，也有學者提出，細胞內的鎳離子會與鐵離子競爭位於酵素的結合位置，致使細胞中的游離鐵數量上升 [33]。所以，我們推測氯化鎳可能會透過增加細胞中的游離鐵來增加細胞中的 ROS，進而造成細胞進行 EMT。將氯化鎳處理 BEAS-2B 的同時，我們分別加入不同濃度的鐵螯合劑 Desferoxamine (DFO) 共同培養 BEAS-2B 細胞，收集細胞的蛋白質，以 western blot 分析，從結果可以看到，細胞在沒有游離鐵的情況下，氯化鎳仍然誘使 E-cadherin 表現變少，fibronectin 增加 (Fig. 3C)，說明氯化鎳並非透過增加細胞中的游離鐵來誘導細胞進行 EMT。

#### 四、氯化鎳誘發細胞產生大量 ROS

接下來我們證實氯化鎳確實誘發 BEAS-2B 細胞產生大量的 ROS 並釐清是產生何種特異性的 ROS。首先以 H<sub>2</sub>DCFDA 來偵測細胞中 ROS 的變化量，確認氯化鎳真的使細胞產生大量的 ROS。H<sub>2</sub>DCFDA 是種脂溶性的特殊螢光劑，可自由地通過細胞膜，H<sub>2</sub>DCFDA 本身不具螢光，但若與活性氧化物質結合，就會被脂酶切割變成 DCF (2',7'-dichlorofluorescein) 並釋出綠色螢光。將 ROS 抑制劑 NAC (10 mM) 前處理 BEAS-2B 細胞 1 小時，再加入氯化鎳共同培養 72 小時。我們將 H<sub>2</sub>DCFDA 加入處理過氯化鎳 72 小時的 BEAS-2B 細胞中反應 30 分鐘，接著將收下的細胞運用流式細胞儀 (flow cytometer) 測量螢光強度，當細胞產生大量 ROS，螢光強度較強，波峰訊號會向右偏移。從分析的結果來看，當細胞單獨處理氯化鎳的情況下，其波峰相較於控制組有明顯向右偏移，也就是所偵測到螢光強度較高，細胞產生較多的 ROS，而氯化鎳與 NAC 共同處理的細胞則訊號右移的現象消失 (Fig. 4A)。

運用 ROS 特異性分子探針，包含 APF (hypochlorite anion indicator)、HPF (hydroxyl radical indicator) 和 DHE (superoxide anion indicator) 分析氯化鎳誘發的 ROS 種類，經氯化鎳處理的細胞，染 APF 和 HPF 後螢光強度都變高，NAC 可抑制此現象，然而，並未偵測到 superoxide anion 的變化 (Fig. 4A)。為了確認氯化鎳是否不使細胞產生大量的 superoxide anion，我們採用另一個實驗方法分析，並以 antimycin A 作為 positive control，螢光測定儀偵測結果顯示，antimycin A 明顯增加細胞中 superoxide anion 的產生，而氯化鎳沒有影響細胞 superoxide 的變化量 (Fig. 4B)。

接著，我們分析 ROS 代謝酵素的表現量，發現氯化鎳誘使 NADPH oxidase 1 (NOX1) 和 SOD2 表現量增加，降低 catalase 和 glutathione peroxidase 1/2 (GPX1/2) 的表現量 (Fig. 4C)。

同時，我們觀察氯化鎳是否會有使細胞粒線體產生去極化作用，細胞經氯化鎳處理 72 小時後加入 JC-1 進行反應，發現氯化鎳誘使 JC-1 由 aggregate form (R2) 轉變成 monomer form (R1)，表示氯化鎳會降低粒線體膜電位 (MMP)，在 NAC 共同處理下，則會抑制氯化鎳所誘導的粒線體膜電位降低 (Fig. 4D)，另將分析結果以柱狀圖表示 (Fig. 4E)。

#### 五、轉錄因子參與氯化鎳誘導細胞進行 EMT

我們發現氯化鎳減少 E-cadherin mRNA (Figure 2A 和 2B)，因此，進一步運用 luciferase assay 來探討氯化鎳是否減少 E-cadherin promoter 活性。首先，將 E-cadherin promoter (-178~+92) 序列 [34, 35] 接在帶有 Luc<sup>+</sup>基因的載體，Luc<sup>+</sup>基因會產出 luciferase，利用 E-cadherin promoter 驅動 luciferase 的表現，以 luciferase 做為一個報導基因，當 E-cadherin promoter 被活化時，luciferase 的表現量會增加，



若 E-cadherin promoter 活性受到抑制時，則 luciferase 表現量變少。帶有 E-cadherin promoter 的 plasmid 與帶有 *LacZ* 基因的 plasmid 共同轉殖至 BEAS-2B 細胞，*LacZ* 基因會產生  $\beta$ -galactosidase，目的在於要以  $\beta$ -galactosidase 的表現量來作為一個 internal control，以校正每個培養皿間細胞的轉殖效率；轉殖後的細胞再加入不同濃度的氯化鎳 (0、0.1、0.25、0.5 mM) 處理細胞 48 小時，最後將細胞溶解並收集，進行 Reporter assay，分別測得其  $\beta$ -galactosidase 和 luciferase 的表現量。我們經計算得到相對的 luciferase 活性，並且畫成柱狀圖，發現 E-cadherin promoter 的轉錄活性，隨著氯化鎳濃度增加而逐漸減少 (Fig. 5A)。

由於我們轉染到細胞的 E-cadherin promoter (-178~+92) 序列中，含有 3 個 E-box [34, 35]。已知一些轉錄抑制因子，例如 Snail、Snail2 (Slug)、ZEB1 和 SIP1 (ZEB2) 會結合到 E-cadherin promoter 的 E-box 上，進而抑制 E-cadherin promoter 的活性 [36-38]。所以，我們接下來以 RT-PCR 分析，觀察氯化鎳是否會影響 BEAS-2B 細胞中 E-cadherin 的轉錄抑制因子，從結果觀察到，氯化鎳提高了 Snail 和 Slug 的 mRNA 表現量，但 ZEB1 和 ZEB2 則不受到氯化鎳的影響 (Fig. 5B)，表示氯化鎳可能是透過 Snail 和 Slug 來調控 E-cadherin 的表現。

轉錄因子 HIF-1 $\alpha$  被證實參與細胞進行 EMT[39]，因而分析 HIF-1 $\alpha$ 、Snail 和 Slug 是否受到氯化鎳影響，從 Western blot 結果我們發現，細胞 HIF-1 $\alpha$ 、Snail 和 Slug 表現量皆隨著氯化鎳處理的濃度而增加 (Fig. 5C)。進一步以 ChIP 分析，發現氯化鎳皆會促使 HIF-1 $\alpha$ 、Snail 和 Slug 結合到 E-cadherin promoter (Fig. 5D)。

接下來我們運用 Lentivirus system，將細胞的 HIF-1 $\alpha$  進行 knockdown，觀察 HIF-1 $\alpha$  表現量低的細胞是否會不受到氯化鎳影響而進行 EMT。確認細胞的 HIF-1 $\alpha$  有被 knockdown 後，加入氯化鎳處理細胞 72 小時，從 western blot 結果我們看到，經氯化鎳處理後，BEAS-2B shHIF-1 $\alpha$  細胞的 fibronectin 增加幅度明顯變小，而 E-cadherin 減少的幅度變小 (Fig. 5E)。

## 六、氯化鎳透過產生 ROS 造成 E-cadherin 啟動子甲基化

表觀遺傳學(Epigenetic)參與 E-cadherin 基因的調控，非小細胞肺癌的 E-cadherin 啟動子異常甲基化，抑制了基因的轉錄作用[40, 41]。為了證明鎳是否影響 E-cadherin 基因表觀遺傳而抑制 E-cadherin 基因表現，因此，細胞前處理甲基轉移酶抑制劑(5-Aza-dC)再加入氯化鎳處理 48 小時，結果發現 5-Aza-dC 能夠回復 0.25 mM NiCl<sub>2</sub> 劑量下的 E-cadherin mRNA 表現(Fig. 6A)。

進一步分析氯化鎳對 E-cadherin 基因的甲基化程度，運用 MSP 和 QMSP 分析，發現鎳促使 E-cadherin 啟動子高度甲基化，若細胞加入 NAC 共同處理，則抑制了 E-cadherin 啟動子甲基化(Fig. 6B)，這些結果顯示，ROS 參與氯化鎳高度甲基化 E-cadherin 啟動子而降低 E-cadherin 表現。

我們也利用 bisulfite sequencing 方法分析 E-cadherin 啟動子(-211~+138)上 CpG islands 的甲基化情形，與控制組相比，經過鎳處理的細胞其 E-cadherin 啟動子 CpG islands 的甲基化比例增加，由其在 CpG island -56 的位子(Fig. 7A)。另外，分析了不同肺癌細胞株(A549、CL1-0、H1299 和 H1355 細胞) E-cadherin 啟動子 CpG islands 甲基化情形，發現 H1299 和 H1355 細胞本身的 E-cadherin 啟動子高度甲基化(Fig. 7B)，這個結果與先前 Fig. 2F 相符，H1299 和 H1355 細胞的 E-cadherin 蛋白表現量較少。

## 討論:

細胞 EMT 是造成組織纖維化和腫瘤轉移的重要過程。過去文獻指出，EMT 會增加細胞 apoptosis resistance、senescence resistance、therapy resistance 和使得細胞具有 stemness 的特性 [42]。鎳化合物

為熟知的致癌物質與人類肺癌細胞的侵襲作用具有相關性[43, 44]。然而，目前尚未有文獻提及腫瘤生成過程中，鎳化合物和 EMT 之間的相關性。

我們的研究證實，無論在較高濃度氯化鎳短時間或低濃度長時間暴露下，皆會誘導 Ad12SV40 轉型過的人類支氣管上皮細胞株 BEAS-2B 細胞進行上皮-間質型轉換，降低上皮型 marker E-cadherin 表現及提高間質型 marker fibronectin 表現，進一步研究發現，氯化鎳透過產生大量 ROS，影響轉錄因子(HIF-1 $\alpha$ 、Snail 和 Slug)及 E-cadherin 啟動子高度甲基化而降低 E-cadherin 的表現(Fig. 8)。

Tiron 和 SOD 的功能皆是消除細胞中的 superoxide anion，結果中發現，Tiron 和 SOD 皆會抑制鎳所產生的 EMT markers 變化 (Figure 5A)，另外，氯化鎳促使 NOX1 表現量增加 (Figure 6C) 以及氯化鎳降低 shSOD2 細胞的 E-cadherin 表現，顯示 superoxide anion 可能參與鎳所誘導的 EMT。然而，在氯化鎳的處理下，我們並沒有偵測到 superoxide anion 的變化 (Figure 6A 和 6B)，superoxide anion 會透過 Haber-Weiss reaction 發生氧化作用，此外，鎳降低 catalase 和 GPX1/2 表現以及增加 SOD2 的表現量 (Figure 6C)，加上 superoxide anion 的半衰期短且會快速的被代謝成較穩定的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，因而難以測得氯化鎳對於細胞中 superoxide anion 的變化。

Myeloperoxidase (MPO) 可將氯離子和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝產生 Hypochlorite anion (OCl<sup>-</sup>)，然而 MPO 只會存在於免疫細胞中 [45]。由於 APF 可同時辨識 OCl<sup>-</sup> and OH<sup>•</sup>，因此，採用特異性辨識 OH<sup>•</sup> 的分子探針 HPF 來區分出氯化鎳所誘導產生的 ROS 種類，顯示鎳主要誘導 OH<sup>•</sup> 產生 (Figure 6A)。另外，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 於二價金屬離子 (例如：Ni<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup>) 存在下，會進行 Fenton reaction 產生 OH<sup>•</sup>，與我們的實驗結果相符。

JC-1 廣泛的運用於分析早期 apoptosis 細胞中粒線體膜電位的變化，實驗結果發現，NAC 誘使 JC-1 單體的產生以及抑制氯化鎳產生更多的 JC-1 單體 (Figure 7A 和 7B)，過去文獻指出，NAC 和 penicillamine (PEN) 促使多種人類腫瘤細胞發生 apoptosis [46]，此研究的 limitation 為選擇最佳的 NAC 濃度以達到避免細胞毒性及減緩 EMT 的現象發生。多條的訊息途徑參與氯化鎳所誘導的 EMT，因而難以透過單一破壞 E-cadherin 的 repressors 來抑制 EMT 的發生，可能需運用多種的抑制劑才足以完整治療肺癌。

癌症的惡化，通常是由於腫瘤細胞產生轉移；國人癌症十大死因中的肺癌，就是具有高度轉移能力的癌症 [27]。癌細胞藉由淋巴或血液系統散佈到身體其他的組織器官，所以腫瘤即使經過手術的切除或採用放射治療，依舊難以根治，造成病人的預後狀況不佳。在癌細胞轉移的過程中，細胞伴隨著許多生理狀態的改變，像是細胞首先會進行 EMT，其中包括了細胞與細胞間交互作用力的破壞、細胞與基底膜之間的結合能力受到改變、細胞的外型發生變化等，因此，研究者多是利用腫瘤細胞株來進行 EMT 的探討 [47]。本研究中所選用的 BEAS-2B 細胞，是經過 Ad12SV40 轉型過的人類支氣管上皮細胞株，其細胞特性介於正常細胞與腫瘤細胞之間，所以，我們選用 BEAS-2B 細胞來探討癌化的過程中，氯化鎳是否會導致細胞產生 EMT。

鎳可活化一些轉錄因子，例如缺氧調控因子 (HIF-1 $\alpha$ )和啟動蛋白 (activating protein-1, AP-1) 和活化轉錄因子等 [5, 48, 49]；而人類肺纖維母細胞 (human lung fibroblasts, HLFs) 的 HIF-1 $\alpha$  和環氧酵素第二型 (COX-2) 會藉由調控發炎反應，來參與血管新生 (angiogenesis) 及纖維化疾病 (fibrotic disorders) [5]。次硫化鎳 (nickel subsulfide, Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>) 會減少人類正常支氣管上皮細胞株(BEAS-2B 細胞)的 uPA 蛋白量及影響其活性，並且細胞的 PAI-1 會與 uPA-receptor complex (uPAR) 結合，進而抑制纖維蛋白的溶解作用 (fibrinolytic cascade) 來促使肺纖維化 [6]。

許多轉錄因子，包括：HIF-1 $\alpha$ 、Snail family (Snail 和 Slug)、Twist、zinc-finger E-box-binding homeobox (ZEB) family (ZEB1 和 ZEB2) 等等，已被證實會來調控細胞進行 EMT，從我們的實驗結果

中發現，氯化鎳會促進 HIF-1 $\alpha$  和 Snail family 的表現增加，但並不影響 ZEB family 的表現。將細胞的 HIF-1 $\alpha$  silence 後，則減緩氯化鎳誘導細胞進行 EMT。所以，未來將進一步釐清氯化鎳如何調控 HIF-1 $\alpha$  來造成 E-cadherin 的表現減少以及深入探討氯化鎳影響 Snail family 的分子機制。

大量的 ROS 會誘使細胞進行 EMT [32]。Lim 等人 [38] 指出 ROS 可透過 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  路徑來增加 E-cadherin 抑制因子 Snail 的表現，Snail 結合到 E-cadherin promoter 上，隨後促使 HDAC、DNMT1 與 Snail 結合，進而造成 E-cadherin promoter 高度甲基化；同時在人類的肝癌細胞中發現，組織含有大量的 ROS，其 E-cadherin 的表現量會減少，Snail 的表現量會增加，並且 E-cadherin promoter 有被甲基化的現象。從我們的 Reporter assay 的結果得知，E-cadherin promoter 活性可受到氯化鎳的調控 (Figure 5A)，其中也發現氯化鎳處理過的 BEAS-2B 細胞，其 Snail 和 Slug 的表現量有增加的趨勢，然而，氯化鎳是否透過 ROS 和 Snail 來影響 E-cadherin 基因的表關遺傳，未來將做進一步詳細的研究。

綜合結論，本研究得知氯化鎳確實可以誘使 BEAS-2B 細胞產生 EMT，我們也對於其中減少 E-cadherin 表現的作用機轉有初步的瞭解，而由於氯化鎳減少 E-cadherin 的表現是透過多重的路徑；所以，用藥方面可能就必須以兩種以上的抑制劑來阻斷氯化鎳對 E-cadherin 的影響。未來，我們可以研究氯化鎳影響間質型標記 fibronectin 的機制，並延續探討 Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 與肺纖維化的相關性，往後更進一步運用實驗動物來加以佐證。

## 誌謝:

感謝國科會 99-2314-B-040 -012 -MY3 計劃提供此研究經費

研究結果投稿於 *The Journal of Biological Chemistry* 2012; 287: 25292-25302 (Published) 與 *Molecular Cancer Research* 2013; 11(5): 518-529 (Published 並獲選為 **highlight issue**)

## 參考文獻

- [1] Chang, F. H.; Wang, H. J.; Wang, S. L.; Wang, Y. C.; Hsieh, D. P.; Chang, L. W.; Ko, Y. C. Survey of urinary nickel in residents of areas with a high density of electroplating factories. *Chemosphere* **65**:1723-1730; 2006.
- [2] Chromium, nickel and welding. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **49**:1-648; 1990.
- [3] NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Subsulfide (CAS No. 12035-72-2) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **453**:1-365; 1996.
- [4] Zhao, J.; Shi, X.; Castranova, V.; Ding, M. Occupational toxicology of nickel and nickel compounds. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **28**:177-208; 2009.
- [5] Brant, K. A.; Fabisiak, J. P. Nickel and the microbial toxin, MALP-2, stimulate proangiogenic mediators from human lung fibroblasts via a HIF-1 $\alpha$  and COX-2-mediated pathway. *Toxicol Sci* **107**:227-237; 2009.
- [6] Andrew, A.; Barchowsky, A. Nickel-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression inhibits the fibrinolytic activity of human airway epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **168**:50-57; 2000.
- [7] Grimsrud, T. K.; Peto, J. Persisting risk of nickel related lung cancer and nasal cancer among Clydach refiners. *Occup Environ Med* **63**:365-366; 2006.
- [8] Andrew, A. S.; Warren, A. J.; Barchowsky, A.; Temple, K. A.; Klei, L.; Soucy, N. V.; O'Hara, K. A.;

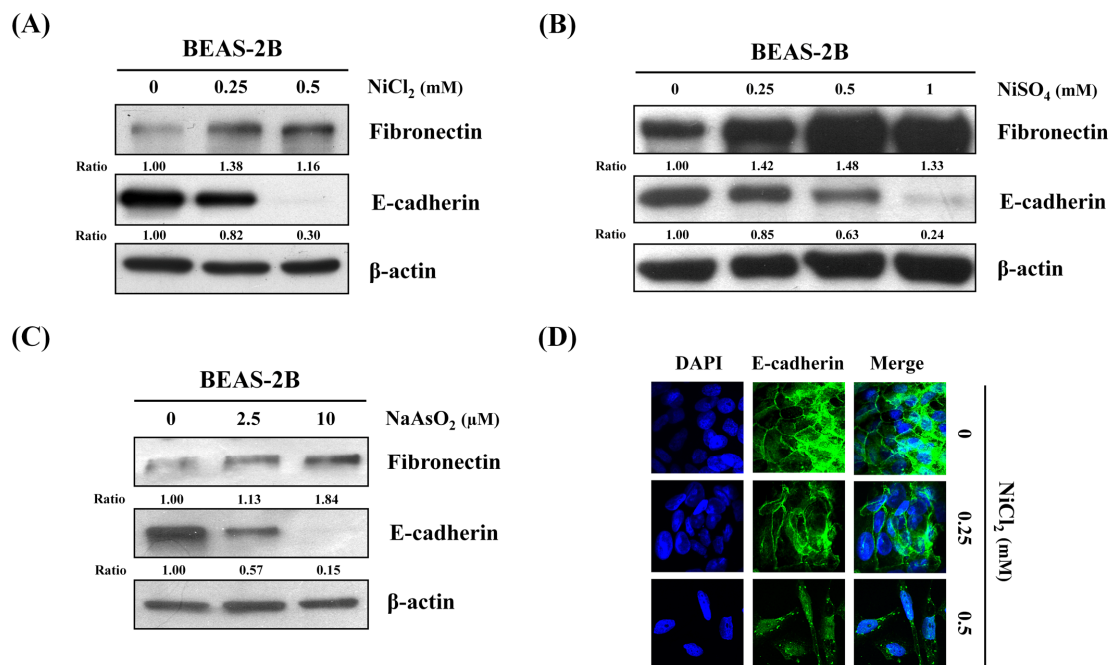
- Hamilton, J. W. Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Environ Health Perspect* **111**:825-835; 2003.
- [9] Kuo, C. Y.; Wong, R. H.; Lin, J. Y.; Lai, J. C.; Lee, H. Accumulation of chromium and nickel metals in lung tumors from lung cancer patients in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A* **69**:1337-1344; 2006.
- [10] Costa, M.; Davidson, T. L.; Chen, H.; Ke, Q.; Zhang, P.; Yan, Y.; Huang, C.; Kluz, T. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat Res* **592**:79-88; 2005.
- [11] Huang, X.; Kitahara, J.; Zhitkovich, A.; Dowjat, K.; Costa, M. Heterochromatic proteins specifically enhance nickel-induced 8-oxo-dG formation. *Carcinogenesis* **16**:1753-1759; 1995.
- [12] Kalluri, R.; Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**:1776-1784; 2003.
- [13] Neilson, E. G. Plasticity, nuclear diapause, and a requiem for the terminal differentiation of epithelia. *J Am Soc Nephrol* **18**:1995-1998; 2007.
- [14] Hay, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* **233**:706-720; 2005.
- [15] Thompson, E. W.; Torri, J.; Sabol, M.; Sommers, C. L.; Byers, S.; Valverius, E. M.; Martin, G. R.; Lippman, M. E.; Stampfer, M. R.; Dickson, R. B. Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clin Exp Metastasis* **12**:181-194; 1994.
- [16] Yang, J.; Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **14**:818-829; 2008.
- [17] Xue, C.; Plieth, D.; Venkov, C.; Xu, C.; Neilson, E. G. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res* **63**:3386-3394; 2003.
- [18] Angst, B. D.; Marcozzi, C.; Magee, A. I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* **114**:629-641; 2001.
- [19] de Boer, C. J.; van Dorst, E.; van Krieken, H.; Jansen-van Rhijn, C. M.; Warnaar, S. O.; Fleuren, G. J.; Litvinov, S. V. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol* **155**:505-515; 1999.
- [20] Quarta, S.; Vidalino, L.; Turato, C.; Ruvoletto, M.; Calabrese, F.; Valente, M.; Cannito, S.; Fassina, G.; Parola, M.; Gatta, A.; Pontisso, P. SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* **221**:343-356.
- [21] Hay, E. D.; Zuk, A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* **26**:678-690; 1995.
- [22] Huber, M. A.; Kraut, N.; Beug, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **17**:548-558; 2005.
- [23] Chou, T. Y.; Chen, W. C.; Lee, A. C.; Hung, S. M.; Shih, N. Y.; Chen, M. Y. Clusterin silencing in human lung adenocarcinoma cells induces a mesenchymal-to-epithelial transition through modulating the ERK/Slug pathway. *Cell Signal* **21**:704-711; 2009.
- [24] Chen, X. F.; Zhang, H. T.; Qi, Q. Y.; Sun, M. M.; Tao, L. Y. Expression of E-cadherin and nm23 is associated with the clinicopathological factors of human non-small cell lung cancer in China. *Lung Cancer* **48**:69-76; 2005.
- [25] Polyak, K.; Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of

- malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9**:265-273; 2009.
- [26] Peinado, H.; Olmeda, D.; Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**:415-428; 2007.
- [27] Thompson, A. B.; Kessinger, A.; Sharp, J. G. A pilot evaluation of micrometastases for the prediction of outcome in lung cancer. *Chest* **125**:156S-157S; 2004.
- [28] Conway, K.; Wang, X. W.; Xu, L. S.; Costa, M. Effect of magnesium on nickel-induced genotoxicity and cell transformation. *Carcinogenesis* **8**:1115-1121; 1987.
- [29] Kang, J.; Zhang, Y.; Chen, J.; Chen, H.; Lin, C.; Wang, Q.; Ou, Y. Nickel-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Toxicol Sci* **74**:279-286; 2003.
- [30] Zhang, A.; Jia, Z.; Guo, X.; Yang, T. Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**:F723-731; 2007.
- [31] Zhou, G.; Dada, L. A.; Wu, M.; Kelly, A.; Trejo, H.; Zhou, Q.; Varga, J.; Sznajder, J. I. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**:L1120-1130; 2009.
- [32] Zhang, K. H.; Tian, H. Y.; Gao, X.; Lei, W. W.; Hu, Y.; Wang, D. M.; Pan, X. C.; Yu, M. L.; Xu, G. J.; Zhao, F. K.; Song, J. G. Ferritin heavy chain-mediated iron homeostasis and subsequent increased reactive oxygen species production are essential for epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* **69**:5340-5348; 2009.
- [33] Chen, H.; Davidson, T.; Singleton, S.; Garrick, M. D.; Costa, M. Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **206**:275-287; 2005.
- [34] Batlle, E.; Sancho, E.; Franci, C.; Dominguez, D.; Monfar, M.; Baulida, J.; Garcia De Herreros, A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**:84-89; 2000.
- [35] Cano, A.; Perez-Moreno, M. A.; Rodrigo, I.; Locascio, A.; Blanco, M. J.; del Barrio, M. G.; Portillo, F.; Nieto, M. A. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**:76-83; 2000.
- [36] Gregory, P. A.; Bert, A. G.; Paterson, E. L.; Barry, S. C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M. A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G. J. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* **10**:593-601; 2008.
- [37] Park, S. M.; Gaur, A. B.; Lengyel, E.; Peter, M. E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* **22**:894-907; 2008.
- [38] Lim, S. O.; Gu, J. M.; Kim, M. S.; Kim, H. S.; Park, Y. N.; Park, C. K.; Cho, J. W.; Park, Y. M.; Jung, G. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology* **135**:2128-2140, 2140 e2121-2128; 2008.
- [39] Yang, M. H.; Wu, M. Z.; Chiou, S. H.; Chen, P. M.; Chang, S. Y.; Liu, C. J.; Teng, S. C.; Wu, K. J. Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **10**:295-305; 2008.
- [40] Maeda, G.; Chiba, T.; Aoba, T.; Imai, K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. *Odontology* **95**:24-29; 2007.

- [41] Chen, C. Y.; Wang, Y. F.; Huang, W. R.; Huang, Y. T. Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **189**:153-159; 2003.
- [42] Sleeman, J. P.; Thiery, J. P. SnapShot: The epithelial-mesenchymal transition. *Cell* **145**:162 e161; 2011.
- [43] Kasprzak, K. S.; Sunderman, F. W., Jr.; Salnikow, K. Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* **533**:67-97; 2003.
- [44] Xu, Z.; Ren, T.; Xiao, C.; Li, H.; Wu, T. Nickel promotes the invasive potential of human lung cancer cells via TLR4/MyD88 signaling. *Toxicology*; 2011.
- [45] Vladimirov, Y. A.; Proskurnina, E. V. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc)* **74**:1545-1566; 2009.
- [46] Guan, D.; Xu, Y.; Yang, M.; Wang, H.; Wang, X.; Shen, Z. N-acetyl cysteine and penicillamine induce apoptosis via the ER stress response-signaling pathway. *Mol Carcinog* **49**:68-74.
- [47] Dasgupta, P.; Rizwani, W.; Pillai, S.; Kinkade, R.; Kovacs, M.; Rastogi, S.; Banerjee, S.; Carless, M.; Kim, E.; Coppola, D.; Haura, E.; Chellappan, S. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* **124**:36-45; 2009.
- [48] Andrew, A. S.; Klei, L. R.; Barchowsky, A. AP-1-dependent induction of plasminogen activator inhibitor-1 by nickel does not require reactive oxygen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:L616-623; 2001.
- [49] Salnikow, K.; Su, W.; Blagosklonny, M. V.; Costa, M. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res* **60**:3375-3378; 2000.

圖表說明：

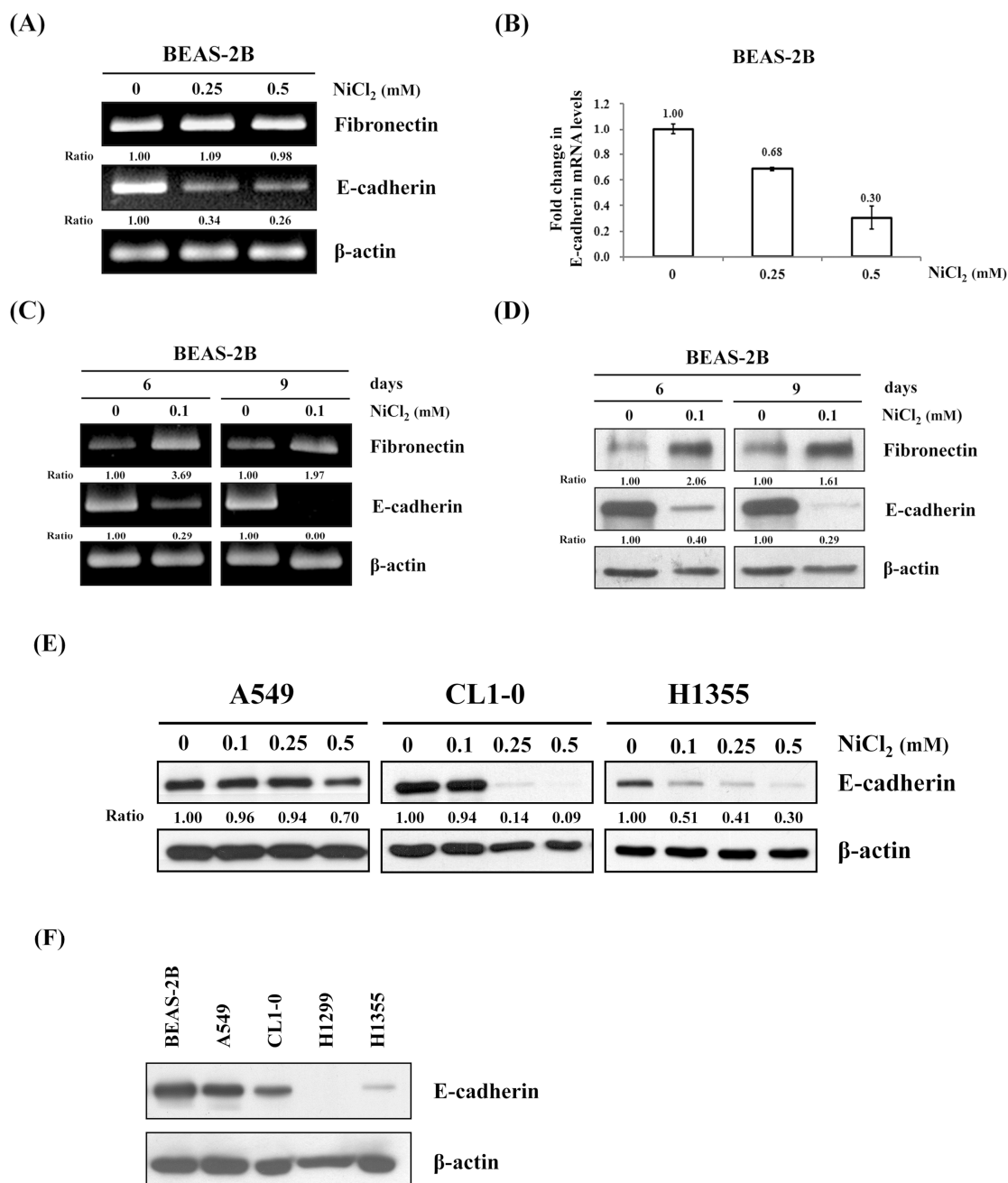
1. 氯化物誘使BEAS-2B細胞發生EMT現象。



**FIGURE 1.** The protein levels of EMT marker in metal compound-treated human BEAS-2B cells. BEAS-2B cells ( $1 \times 10^6$  cells/ 6 cm dish) were treated with (A) nickel chloride (NiCl<sub>2</sub>) 0, 0.25, 0.5 mM, (B) nickel sulfate (NiSO<sub>4</sub>) 0, 0.25, 0.5, 1 mM, or (C) sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) 0, 2.5, 10 μM for 72 h and protein levels of fibronectin and

E-cadherin were detected on Western blot.  $\beta$ -actin was used as the internal control. The relative ratios of fibronectin/ $\beta$ -actin and E-cadherin/ $\beta$ -actin are shown. (D)  $\text{NiCl}_2$  (0, 0.25, 0.5 mM) for 72 h and immunofluorescence staining for E-cadherin (green) plus DAPI counterstaining for DNA (blue). Original magnification,  $\times 630$ .

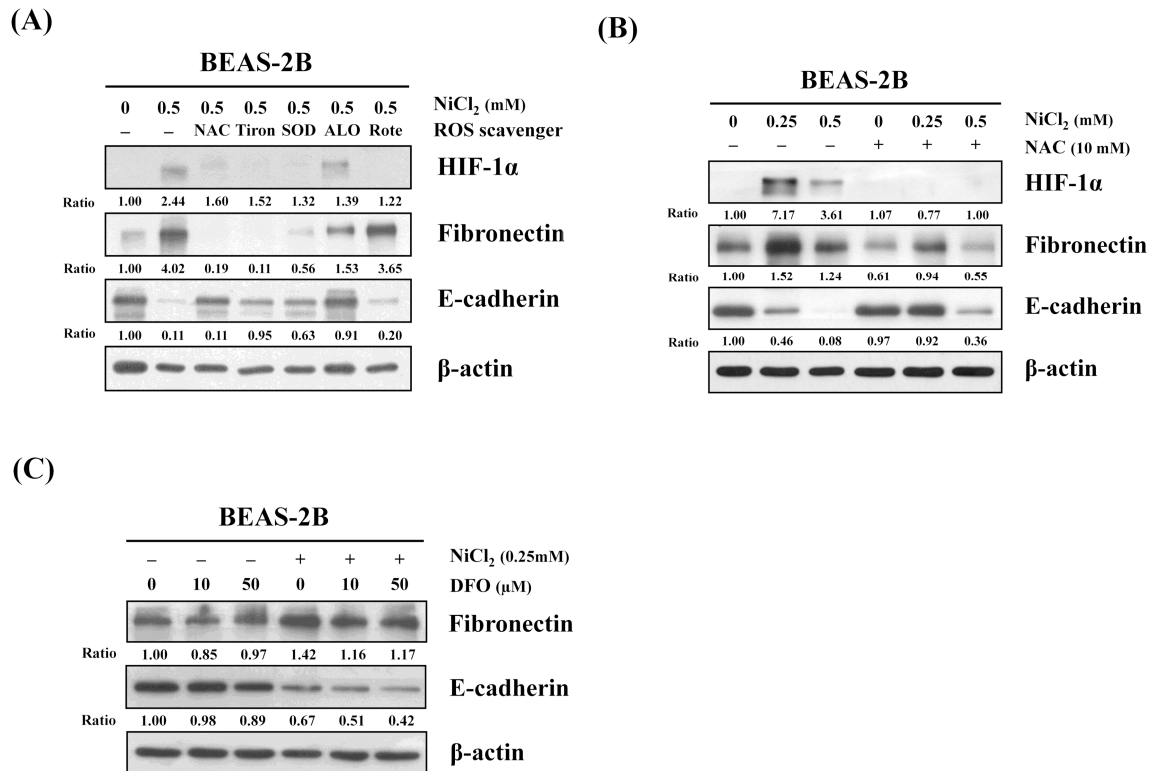
## 2. 氯化鎳減少 E-cadherin mRNA 表現以及減少不同肺癌細胞 E-cadherin 表現



**FIGURE 2.** The effects of  $\text{NiCl}_2$  on EMT in BEAS-2B cells. (A) BEAS-2B cells ( $1 \times 10^6$  cells/6 cm dish) were treated with  $\text{NiCl}_2$  (0, 0.25, 0.5 mM) for 48 h and mRNA levels of fibronectin and E-cadherin were determined on RT-PCR.  $\beta$ -actin was used as the internal control. The relative ratios of fibronectin/ $\beta$ -actin and E-cadherin/ $\beta$ -actin are shown. (B) Quantitative real-time PCR analysis was used to detect E-cadherin expression with total RNA extracted from cells treated with  $\text{NiCl}_2$  (0, 0.25, 0.5 mM) for 48 h. All values have been normalized to the level of GAPDH and are the averages of three independent readings. (C) During the time-course study, BEAS-2B cells were exposed to  $\text{NiCl}_2$  (0 and 0.1 mM) for the indicated times. The EMT marker expressions were analyzed on RT-PCR (D) and Western blot.

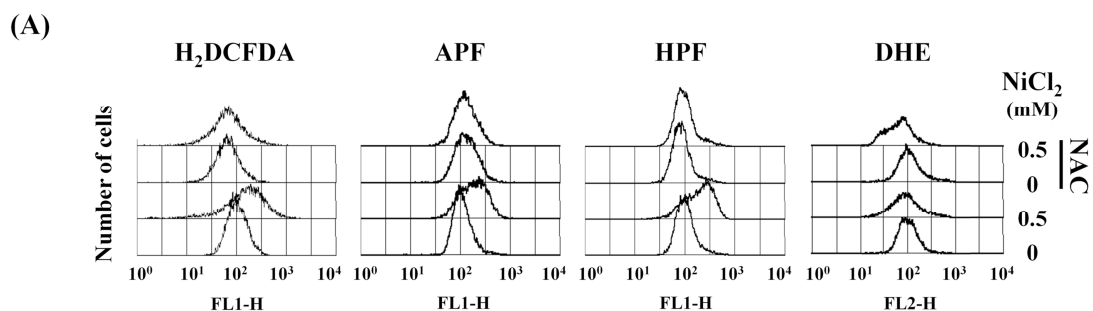
$\beta$ -actin was used as the internal control. The relative ratios of fibronectin/ $\beta$ -actin and E-cadherin/ $\beta$ -actin are shown. (E) A549, CL1-0 and H1355 lung cancer cells ( $5 \times 10^5$  cells/ 6 cm dish) were treated with  $\text{NiCl}_2$  (0, 0.1, 0.25 and 0.5 mM) for 72 h and the protein levels of E-cadherin were detected on Western blot.  $\beta$ -actin was used as the loading control. The relative ratios of E-cadherin/ $\beta$ -actin are shown. (F) The protein levels of E-cadherin in BEAS-2B, A549, CL1-0, H1299 and H1355 cells. Thirty  $\mu\text{g}$  total proteins were loaded onto each lane for Western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as the internal control.

### 3. ROS 參與氯化鎳所誘導的 EMT

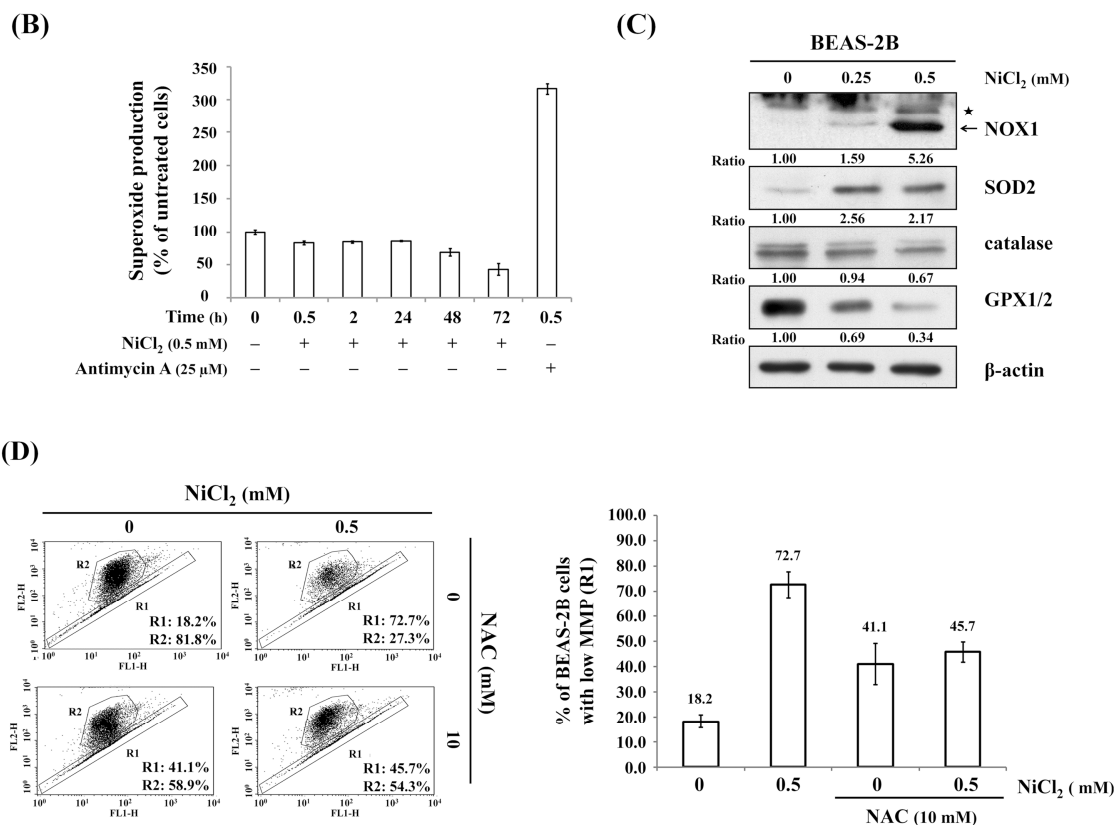


**FIGURE 3.** ROS are involved in  $\text{NiCl}_2$ -induced EMT. (A) BEAS-2B cells ( $1 \times 10^6$  cells/6 cm dish) were pre-incubated with NAC 10 mM, Tiron 10 mM, SOD 500U/ml, allopurinol (ALO) 200  $\mu\text{M}$  or rotenone (Rote) 1 $\mu\text{M}$  for 1 h followed by culture with or without  $\text{NiCl}_2$  0.5 mM for 72 h. (B) BEAS-2B cells were pretreated with 10 mM NAC for 1 h followed by exposure to  $\text{NiCl}_2$  (0, 0.25, 0.5 mM) for 72 h. (C) BEAS-2B cells were treated with  $\text{NiCl}_2$  (0 and 0.25 mM, respectively) with or without Desferrioxamine (DFO) (0, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) for 72 h. The protein levels were determined on Western blot analysis.  $\beta$ -actin was used as the internal control. The relative ratios of HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin, fibronectin/ $\beta$ -actin and E-cadherin/ $\beta$ -actin are shown.

### 4. 氯化鎳誘發細胞產生大量 ROS

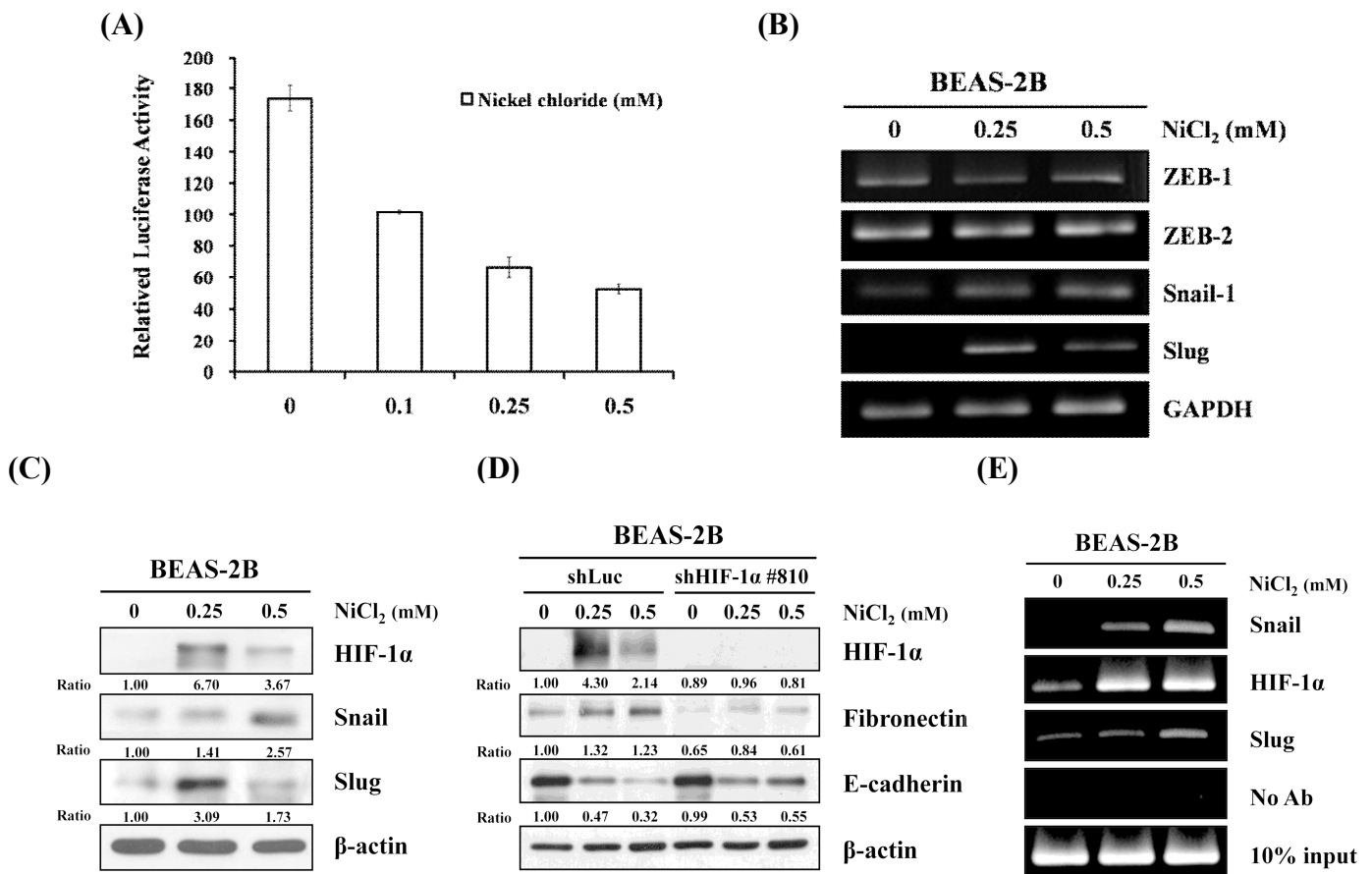






**FIGURE 4.** NiCl<sub>2</sub> induces ROS generation. (A) BEAS-2B cells (1 X 10<sup>6</sup> cells) were pretreated with 10 mM NAC for 1 h followed by exposure to NiCl<sub>2</sub> 0.5 mM for 72 h. The cells were stained with H<sub>2</sub>DCFDA 10 μM (ROS indicator), APF 10 μM (hypochlorite anion indicator), HPF 10 μM (hydroxyl radical indicator) or DHE 10 μM (superoxide anion indicator) dye and analyzed by flow cytometry. (B) Cells were treated with NiCl<sub>2</sub> 0.5 mM for 0.5, 2, 24, 48, and 72 h or antimycin A 25 μM for 30 min (positive control). Superoxide anion production was measured by ethidium fluorescence generated from DHE (10 μM) by fluorescence spectroscopy and expressed as the percentage of untreated cells. (C) Cells were treated with NiCl<sub>2</sub> 0, 0.25, 0.5 mM for 72 h and protein levels of NADPH oxidase 1 (NOX1), SOD2, catalase and glutathion peroxidase (GPX1/2) were detected on Western blot. β-actin was used as the internal control. Asterisk (★) represents a non-specific band. The relative ratios of NOX1/β-actin, SOD2/β-actin, catalase/β-actin and GPX1/2/β-actin are shown. (D) BEAS-2B cells were untreated/treated with 0.5 mM NiCl<sub>2</sub>, as well as 0 or 10 mM NAC for 72 h. The changes in mitochondrial membrane potential (MMP) were assessed by the intensity of green fluorescence (R1) and red fluorescence (R2) of JC-1. Bar graph shows the quantification changes in JC-1 fluorescence in the presence of NiCl<sub>2</sub> with/without NAC cotreatment as detected on flow cytometry assay. There was interaction between NiCl<sub>2</sub> and NAC with NiCl<sub>2</sub> decreasing JC-1 fluorescence in the presence of NAC. Data are presented as mean ± S.E.M.

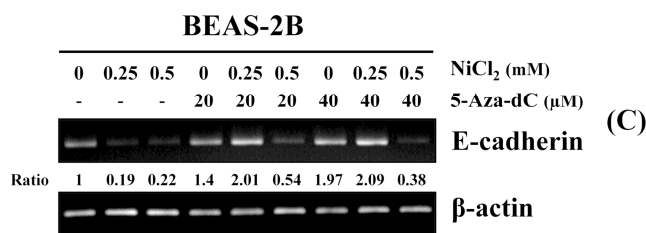
## 5. 轉錄因子參與氯化鎳誘導細胞進行 EMT



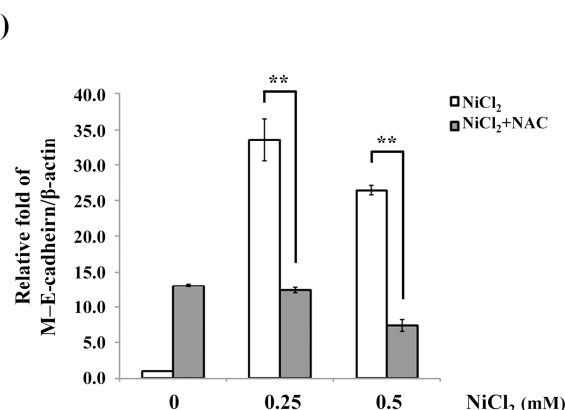
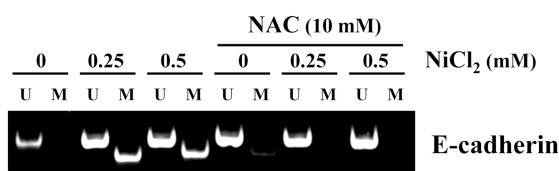
**FIGURE 5.** HIF-1 $\alpha$ , Snail and Slug are involved in Ni-induced EMT. (A) After transfection, BEAS-2B cells ( $2 \times 10^5$  cells/ well) were treated with nickel chloride (0, 0.1, 0.25, 0.5 mM, respectively) for 48 h. The transcriptional activity of each reporter plasmid was normalized relative to  $\beta$ -galactosidase activity, and the activity in cells transfected with pGL3 basic vector was set at 1.0. (B) BEAS-2B cells ( $1 \times 10^6$  cells/ 6 cm dish) were treated with nickel chloride (0, 0.25, 0.5 mM, respectively) for 48 h. The mRNA levels were analyzed by RT-PCR. GAPDH is as an internal control. (C) Western blot analysis shows HIF-1 $\alpha$ , Snail and Slug expressions in protein lysates from BEAS-2B cells ( $1 \times 10^6$  cells) treated with NiCl<sub>2</sub> at the indicated dosages for 72 h.  $\beta$ -actin was used as the internal control. The relative ratios of HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin, Snail/ $\beta$ -actin and Slug/ $\beta$ -actin are shown. (D) HIF-1 $\alpha$ , fibronectin and E-cadherin protein levels were determined on Western blot using protein lysates from cells treated with NiCl<sub>2</sub> for 72 h after infection with lentivirus carrying shHIF-1- or vector control.  $\beta$ -actin was used as the internal control. The relative ratios of HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin, fibronectin/ $\beta$ -actin and E-cadherin/ $\beta$ -actin are shown. (E) ChIP assay was performed on BEAS-2B cells treated with NiCl<sub>2</sub> for 48 h. The precipitated chromatin was PCR-amplified with the use of specific primers with E-boxes in the E-cadherin promoter. *In vivo* identification of reciprocal E-box occupancy by Snail or HIF-1 $\alpha$  at the E-cadherin promoter in BEAS-2B cells was carried out. No antibodies were used as negative control. Input: PCRs performed on total chromatin from BEAS-2B cells. Ab: antibody.

## 6. 氯化鎳透過產生 ROS 造成 E-cadherin 啟動子甲基化

(A)



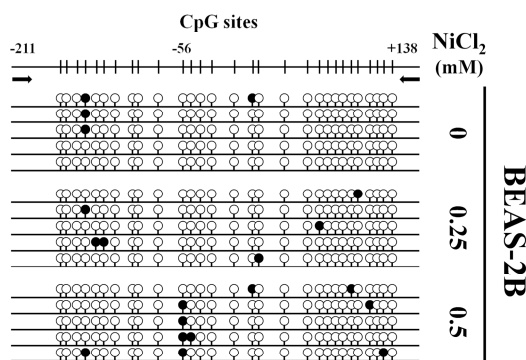
(B)



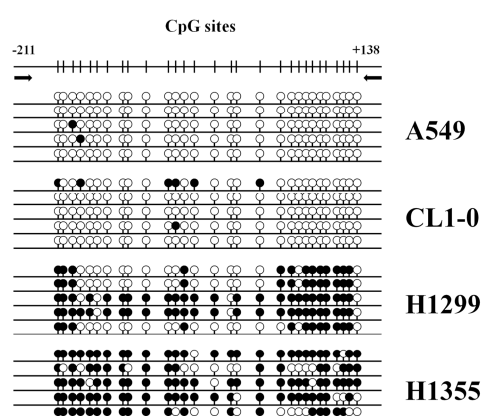
**FIGURE 6.** Epigenetic effects of NiCl<sub>2</sub> down-regulate E-cadherin expression. (A) BEAS-2B cells were treated with NiCl<sub>2</sub> (0, 0.25, 0.5 mM) and 5-Aza-dc (0, 20, 40 μM) for 48 h. The mRNA levels of fibronectin and E-cadherin were determined by RT-PCR. β-actin was used as the internal control. The relative ratios of E-cadherin/β-actin are shown. (B) Methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) (MSP) assays were performed after BEAS-2B cells were pretreated with/without 10 mM NAC, and then treated with NiCl<sub>2</sub> for 48 h. Visible PCR product in *Lanes U* indicates the presence of unmethylated alleles; visible PCR product in *Lanes M* indicates the presence of methylated alleles. (C) Quantitative real-time MSP (QMSP) analysis confirmed the same sample. DNA methylation of E-cadherin was calculated as the relative expression compared to β-actin. Each bar represents the mean ± SD of triplicate experiments; \*\* p<0.01.

## 7. Bisulfite sequencing 分析 E-cadherin 啟動子 CpG islands 的甲基化情形

(A)

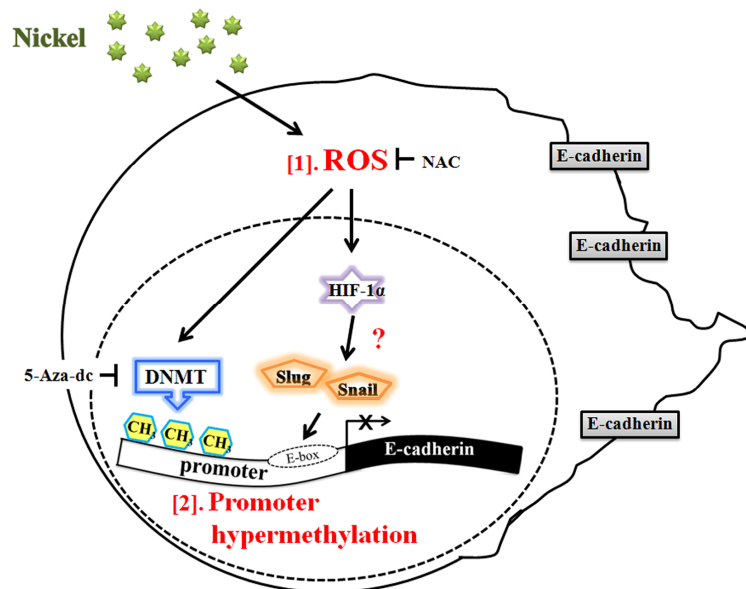


(B)



**FIGURE 7.** Bisulfite genomic sequencing of E-cadherin promoter (-211~+138). Methylation status of CpG sites around the E-cadherin promoter region was analyzed in (A) BEAS-2B cell line following treatment with NiCl<sub>2</sub> (0, 0.25 and 0.5 mM) and (B) lung cancer cell lines (A549, CL1-0, H1299 and H1355 cells). Region spans -211 to +138 including 29 CpG sites. Each row represents an individual subclone. White circles represent unmethylated CpGs. Black circles represent methylated CpGs.

## 8. 結論圖



**FIGURE 8.** Model depicting the mechanisms of Ni-repressed E-cadherin in BEAS-2B cells. [1] Ni induces ROS generation and up-regulation of HIF-1 $\alpha$ . Transcription factors, such as Snail and Slug, may be activated and inhibit expression of E-cadherin. [2] Ni represses E-cadherin by promoter hypermethylation via ROS generation.

# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/05/29

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討重金屬氯化鎳誘發肺上皮細胞株上皮-間質相互轉換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)表現機制及開發反轉機轉與減緩肺癌惡化之關係
	計畫主持人: 柯俊良
	計畫編號: 99-2314-B-040-012-MY3      學門領域: 公共衛生及環境醫學
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：柯俊良		計畫編號：99-2314-B-040-012-MY3					
計畫名稱：探討重金屬氯化鎳誘發肺上皮細胞株上皮-間質相互轉換(epithelial-mesenchymal transition; EMT)表現機制及開發反轉機轉與減緩肺癌惡化之關係							
成果項目		量化			單位	備註(質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等)	
		實際已達成數(被接受或已發表)	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	3	3	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力(本國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力(外國籍)	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>參加亞太毒理學研討會壁報展，發表國際期刊 Molecular Cancer Research 2013； 11(5): 518-529 獲選為 highlight issue</p>
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

國際癌症研究中心(Internation Agency for Research on Cancer; IARC)將鎳化合物歸類為第一類致癌物。吸入任一種鎳化合物，皆會刺激動物呼吸道、引起化學性肺炎、肺癌以及不同程度的肺部細胞損傷。本研究發現，鎳化合物會誘使細胞產生上皮-間質型轉換，進一步探討氯化鎳減少細胞結合蛋白 E-cadherin 的機轉，鎳透過產生大量的 ROS 進而影響轉錄因子 HIF-1 $\alpha$  與 E-cadherin 啟動子高度甲基化，這可能參與鎳所造成的組織纖維化和細胞癌化的過程。因此，公共衛生及環境醫學領域中，受到重金屬對肺組織的傷害及肺腫瘤轉移的用藥資訊，可能就必須以兩種以上的抑制劑來阻斷氯化鎳誘導細胞進行 EMT 及回復 E-cadherin 的表現。