

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

麩麩麩麩麩-M2 減緩肺癌細胞 DNA 傷害與阻斷 MDM2 mRNA  
短小缺失之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2311-B-040-003-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：柯俊良

報告類型：精簡報告

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 95 年 10 月 31 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

麩胱甘胺太轉移酶-M2 減緩肺癌細胞 DNA 傷害與阻斷 MDM2 mRNA 短小缺失之探討

Glutathione S-transferase M2 protects against DNA damage and alleviate *MDM2* splicing by Benzo[*a*]pyrene Diol-Epoxyde in human lung carcinoma

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2311-B-040-003-

執行期間： 94 年 8 月 1 日至 95 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 95 年 10 月 25 日

## 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：麩胱甘胺太轉移酶-M2 減緩肺癌細胞 DNA 傷害與阻斷 MDM2 mRNA 短小缺失之探討 計畫主持人：柯俊良 計畫編號：NSC 94-2311-B-040-003- 學門領域：BF3
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

麩胱甘胺太轉移酶-M2 減緩肺癌細胞 DNA 傷害與阻斷 MDM2 mRNA 短小缺失之探討

Glutathione S-transferase M2 protects against DNA damage and alleviate MDM2 splicing by Benzo[a]pyrene Diol-Epoxyde in human lung carcinoma

計畫編號：NSC 94-2311-B-040-003-

執行期限：94 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：

本研究團隊之前對 117 位非小細胞肺癌病人及 70 位非肺癌病人組織中的 MDM2 mRNA 表現情形進行分析，證實肺癌病人組織中的 MDM2 mRNA 選擇性短小變異比例為 26.4% (n=31) 明顯高於非肺癌病人 (8.5%, n=6) ( $p < 0.001$ )；其中抽煙習慣及性別與 MDM2 mRNA 的選擇性短小變異發生有高度的正相關性，而 MDM2 mRNA 選擇性短小變異型態又以具有腫瘤惡質化特性的 MDM2-657 居多。本研究欲進一步探討是否香菸中的毒性物質可造成 MDM2 mRNA 選擇性短小變異。將 H1355 細胞處理於香菸中多環芳香烴化合物；Nested RT-PCR 分析發現：B[a]P 與 BPDE 於  $1 \mu\text{M}$  及  $0.5$ 、 $2 \mu\text{M}$  可誘發三種選擇性短小變異的 MDM2 mRNA 表現。值得注意的是，透過序列分析選擇性短小變異的 MDM2 mRNA 發現缺失部位存有某些特定序列。另外，Actinomycin D 預處理可有效抑制 BPDE 誘發 MDM2 mRNA 發生選擇性短小變異。本研究結果證實香菸中所含的毒性物質-B[a]P 及 BPDE 會造成 MDM2 mRNA 發生選擇性短小變異。本研究分析多株正常肺細胞與肺癌細胞中毒物代謝酵素-麩胱甘胺轉移酶酵素活性，發現在正常肺細胞株中以 MRC-5 表現量最高，肺癌細胞株中以 A549 表現量最高而 H1355 表現量最低。比較 H1355 及 MRC-5 細胞在 BPDE 處理下，MDM2 mRNA 發生選擇性短小變異的情形，結果發現僅 H1355 細胞發生 MDM2 mRNA 選擇性短小變異，而 MRC-5 細胞則無此現象。因此，以 RT-PCR 增幅 MRC-5 細胞中 GST-M2 及 M4 的基

因表現，並將 GST-M2 或 M4 基因穩定表現於 H1355 肺癌細胞株。Nested-RT PCR 及競爭性 ELISA 分析發現，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。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 BPDE 所造成的 DNA adducts，並減緩 MDM2 mRNA 發生選擇性短小變異；同時也說明了 GST-M2 酵素活性對於降低 BPDE 造成之 DNA 傷害可能扮演重要的角色。

Key words: alternative splicing, GST-m2, BPDE

## 英文摘要

The collective results from laboratories of Professors Huei Lee, and Jiunn-Liang Ko have shown that the frequency of MDM2 splice variants in lung cancer patients (31 of 117; 26%) was significantly higher than that of nontumor patients (6 of 70; 8.57%). Interestingly, there was a higher frequency of MDM2 splice variants for smokers and males, while the major splice variant was MDM2-657, a splice variant that was significant associated with tumor malignance. First of all, the study investigated whether the toxins of cigarette smoking would induce alternative splicing of MDM2 mRNA. After H1355 cells being treated in vitro with PAHs, B[a]P or the B[a]P metabolite benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)-mediated MDM2 splicing were detected by nested RT-PCR. It was

demonstrated that splicing occurred at cryptic splice donor and acceptor sites in regions with high sequence homology. In addition, BPDE-induced *MDM2* splicing was prevented with the actinomycin D treatment prior to BPDE exposure. Finally, to investigate whether the formation of DNA adducts could increase the frequency of *MDM2* splicing and explore cellular factors able to prevent DNA adduct formation and further alleviate *MDM2* splicing, the enzyme activities of total GST of normal and tumor lung cell lines were analyzed. Results showed that the GST activity was the highest in MRC-5, among normal lung cells, and in A549 among lung cancer cells. Interestingly, the catalytic activity of H1355 was undetectable. Therefore, on the same dosage of BPDE-2  $\mu$ M, the alternative splicing of *MDM2* was only detected by nested RT-PCR in H1355 cells but not in MRC-5 cells. The results of nested RT-PCR and competitive ELISA demonstrated that overexpression of GST-M2 could prevent DNA adduct formation and further alleviate *MDM2* splicing.

#### 緒言:

當細胞暴露到外在環境中的傷害或是毒性物質-例如BPDE時，都會使細胞中的DNA受到傷害；BPDE是造成DNA傷害的主要毒性物質，因為BPDE可直接共價結合到DNA序列上第二鹼基位置的deoxyguanosine上，造成DNA在轉錄機制上發生錯誤，而使得細胞內基因的表現受到影響。當細胞受到這類傷害時也會有相對應的機制被啟動，例如細胞會啟動訊息傳遞路徑以活化細胞中的DNA修復機制，並暫停細胞週期的進行 (cell cycle arrest) 以便細胞將受傷的DNA進行修補或是將無法修補的細胞進行細胞凋亡，以減少將有問題的遺傳訊號傳遞到子代。當細胞受到傷害時，透過growth/survival factor receptor的活化可進一步活化PI3K family，其中DNA-protein kinase (DNA-PKcs)也是其中的一員。在先前的研究指出，DNA-PKcs催化活性區域內由93 bp 鹼基所轉譯出的

一段蛋白會參予mRNA選擇性短小變異的發生 (mRNA alternative splicing) (1)。當細胞受到DNA傷害時 (例如BPDE所造成的DNA傷害)，會啟動細胞的反應機制並活化訊息傳遞路徑所調控的相關基因表現，因此當phosphatidylinositol-3 kinase受到活化時便會啟動DNA-PKcs，而DNA-PKcs被活化時可進一步的結合到mRNA上的splicing位置而造成mRNA的選擇性短小變異 (2)。而分析MDM2基因的序列中也發現有兩個PKC磷酸化位置 (TKR and SVK)，然而是否與BPDE造成MDM2 mRNA發生選擇性短小變異仍需更進一步探討。

在人類的組織中，存有許多不同的細胞保護機制；而phase II酵素可保護DNA不受BPDE傷害 (3-5)。其中，GST是細胞中主要的phase II 解毒酵素，GST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)。表現於細胞質的GST依其序列不同可分為五種同工異構酶 (Alpha、Mu、Pi、Theta、Zeta) (7)，它可催化麩胱甘肽 (GSH)與親電性的受質結合，降低細胞外在或內部有毒物質的傷害 (8)；而人類的組織中也同時存在著多種不同種類的GST，不同的GST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，GST-Pi (acidic GST)的RNA表現量是正常組織中的2-4倍 (11)；而GST-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GST-Pi的表現量最明顯。Mu-class 及 pi-class GST可催化多種受質，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GST作用而降低，其中又以Mu 家族GST對於多環芳香烴類之代謝物 (例如:BPDE) 的活性最強；其次為GSTP1-1與GSTA1-1 (15)，而Mu家族中又以M2的活性最強，其次為M1、M3、

M4 (16)。近來的研究也指出，Mu家族中的GST-M2可專一性的將catecholamine代謝成為quinones (例如將dopamine氧化代謝成dopaminochrome)；已知GST-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 (17)。GST-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經由與GSH鍵結後的親電性鍵結物結合 (18)。

#### 實驗步驟:

##### (1) 利用 RT-PCR 增幅 麩胱甘肽轉移酶 -M2與M4的基因表現

將自 MRC-5 及 H1355 細胞株萃取的 total RNA (1  $\mu$ g)，以 random hexamer primers、murine leukemia virus reverse transcriptase 合成 cDNA。接著，再以 1  $\mu$ g 之 cDNA 與 麩胱甘肽轉移酶-Mu 的專一性引子進行鏈聚合酶連鎖反應 (PCR)，以 33 週期之基因增幅，其專一性引子 (primers) 設計 (2) 麩胱甘肽轉移酶基因序列分析

以自動定序儀進行序列分析 (377 DNA Sequencer, ABI PRISM PE, Applied Biosystem) 分析以不同引子合成的 DNA 產物，並將所得之序列結果與發布於 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站之序列資料庫進行比對。

##### (2) 麩胱甘肽轉移酶之活性測定

為了要測定可穩定表現 GST-M2 與 GST-M4 之 H1355 細胞中的酵素活性，首先種植  $1 \times 10^6$  的細胞數於 6 公分的細胞培養皿上；待第二天時先以磷酸緩衝液 (phosphate-buffered saline) 清洗後再利用 100 mM potassium phosphate (pH 6.5) 緩衝液收集細胞並以超音波將細胞破碎。將以破碎之細胞懸浮液進行 12000xg 離心，待 10 分鐘後取上清液進行蛋白濃度測定 (參照 Bradford) (19) 及 麩胱甘肽轉移酶活性測定。

參照 Habig and Jakoby 等人所提出之

測定方法 (20)，以 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 做為測定 GST 酵素活性的受質；活性測定的反應體積固定為 100  $\mu$ l，其中包含磷酸鉀緩衝液 (0.1 M, pH 6.5)、1 mM CDNB、1 mM GSH 及 20  $\mu$ l 之待測定細胞懸浮液 (細胞濃度固定為 1  $\mu$ g/ $\mu$ l)。當待測的細胞懸浮液加入後反應即開始進行，反應以每十秒測定一次由 GST 催化 GSH 與 CDNB 受質鍵結時所放出之波長 340 nm 的可見光強度，藉以側定 GST 的酵素活性，而酵素活性以  $\mu$ mol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>protein 表示。

##### (3) 構築可穩定表現 麩胱甘肽轉移酶 -M2、M4 與 Empty vector 之 H1355 細胞株

待定序結果確定後，進一步將所得之 PCR 產物選殖至 TA 選殖載體上 (TA cloning kit, Yeastern Biotech Co, Taipei, Taiwan)，再進一步以 BamHI 及 EcoRI 限制酶切位選殖到表現載體 (FLAG tagging pCDNA vectors)。最後進行轉形反應 (transformation) 至 *E. coli* XL-10，並萃取質體 DNA 及自動定序儀分析。

同時將 H1355 細胞以適當的生長環境及條件進行培養 (humidified 5% CO<sub>2</sub> environment at 37 °C using an RPMI-1640 medium with the supplements 5 % fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 0.03 % L-glutamine)，之後以  $1 \times 10^6$  的細胞數目培養於 60 mm 培養皿，並於 18 小時後進行細胞轉染實驗。細胞主要以 lipofectamine reagent (Invitrogen, Life Technologies) 進行細胞轉染試驗；首先將欲轉染之質體 DNA (6  $\mu$ g) 與不含血清之細胞培養液 (RPMI-1640 without serum) 混合至體積為 300  $\mu$ l，稱之為 A buffer；同時取 6  $\mu$ l 之 Lipofectamine reagent 與 294  $\mu$ l 的細胞培養液 (RPMI-1640 without serum) 混合，稱之為 B buffer。最後將 A 及 B buffer 均勻混合並於室溫作用 20 分鐘後再加入 1.8 ml 的細胞培養液 (RPMI-1640 without serum)。待均勻混合後緩慢滴入以用 1x PBS 清洗過之細胞培養皿中，於作用後第 6 小時加入 2.4

ml 含有血清之細胞培養液再繼續培養18小時。最後收集細胞蛋白萃取物並進行西方轉漬法分析並以專一性的GST-Mu及Flag抗體分析。

在此同時，將已轉染24小時的H1355細胞以1X TE buffer作用，使細胞脫離培養皿表面，細胞密度定量為 $1 \times 10^3$ /ml再以100  $\mu$ l/well分別加到96孔細胞培養盤上，在進行培養的同時並加入G418 (400  $\mu$ g/ml)藉以篩選可單獨表現麩胱甘肽轉移酶-M2、M4及FLAG tagging pcDNA載體的H1355細胞株。

#### (4) 構築可穩定干擾麩胱甘肽轉移酶-M2 表現載體轉染至 MRC-5 細胞

主要使用 pSuppressor plasmid (IMGENEX 提供)，藉由 HU6 promoter 所駕馭的載體後接者 GST-m2 基因標的以 In vitrogen 網站提供設計 interference primer，形成 19 base pair stem loop 與 3 端二個 uridines overhangs 的 small hairpin RNA (ShRNA) 結構。構築成的載體轉染至 MRC-5 細胞並以 RT-PCR 測定 GST-M2 表現量 GST 活性

#### (5) 細胞培養及致突變藥劑、RNA 萃取與 RT-PCR 分析

MRC-5 (來自正常肺部組織) 及 H1355 (來自肺表皮腫瘤) 細胞株均購於 American Type Tissue Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.。所有的細胞培養條件與培養液均參照 ATCC 所建議，而細胞生長於含有 95% 空氣及 5% 二氧化碳的 37°C 培養箱中。

在進行細胞加藥實驗時；首先將 H1355、H1355/GST-M2 transfectants、H1355/GST-M4 transfectants、H1355/empty vector transfectants 或 MRC-5 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 或 BME 培養液中，其生存環境為 37°C 並含有 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱。在進行實驗之前，將固定數目 ( $1 \times 10^6$ ) 的細胞培養於 6-cm 的培養皿並於細胞培養箱培養 18 小時；而實驗進行時其內含 DMSO 體積均不超過總體積的

0.1%。接著將細胞分別處理濃度為 2  $\mu$ M 的 BPDE，再於處理後的第四小時萃取細胞的 RNA；並將得到的 RNA 進行 reverse transcription 後再利用 nested PCR 分析 MDM2 的表現情形；根據 Matsumoto et al., 自 1998 年所發表論文之實驗方法中 oligodeoxynucleotide primer 及 PCR 條件加以修飾，其所用之 primers 表示於 table II。

首先，利用 External primer 進行第一次的 PCR 反應，其反應條件如下：denature: 95°C、5 分鐘，【denature: 95°C、30 秒，annealing: 56°C、90 秒，elongation: 68°C、2 分鐘】x 25 cycle，最後以 68°C 反應 6 分鐘。再將第一次 PCR 的產物稀釋 10 後取 1  $\mu$ l 做為第二次 PCR 的模版，以 Internal primer 進行第二次 PCR，反應條件如下：denature: 95°C、5 分鐘，【denature: 95°C、30 秒，annealing: 56°C、90 秒，elongation: 68°C、2 分鐘】x 33 cycle，最後以 68°C 反應 6 分鐘。本實驗所使用的聚合酶鏈鎖反應器為 Perkin Elmer 2400 PCR system，而所得到的產物最後以 1% Agarose gel 進行電泳分析，以 5  $\mu$ g/ml EtBr 浸染 10 分鐘後，在紫外燈下觀察結果。

#### (6) 以西方轉漬法分析麩胱甘肽轉移酶-M2 及 M4 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) (19) 並以西方轉漬法分析蛋白表現。首先，取 50  $\mu$ 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 GST-mu 抗體 (1000 稀釋之 rabbit polyclonal anti-human GST-Mu 抗體) 或專一性辨認 FLAG 片段

之抗體 (2000 倍稀釋之 anti-FLAG M2 antibody, Sigma), 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 麩胱甘肽轉移酶-Mu, 10000 稀釋) (horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse IgG for FLAG, 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。

#### (7) 評估不同程度的麩胱甘肽轉移酶-M2 活性是否會影響 BPDE-DNA adduct 的移除能力

在構築穩定表現麩胱甘肽轉移酶-M2 細胞株的過程中, 本研究進一步的收集不同的麩胱甘肽轉移酶-M2 clones, 並分析其活性及細胞中的麩胱甘肽轉移酶-M2 蛋白表現情形; 發現所收集的不同麩胱甘肽轉移酶-M2 clones 之間的麩胱甘肽轉移酶-M2 蛋白表現其活性均有差異。為了要說明當細胞中表現不同程度的麩胱甘肽轉移酶-M2 酵素活性會影響其對於 BPDE-DNA adducts 移除的能力, 因此本研究分別選取其中最高與最低的麩胱甘肽轉移酶-M2 表現細胞株處理 BPDE, 並利用競爭性 ELISA 來評估兩株表現不同程度之麩胱甘肽轉移酶-M2 的細胞株對於 BPDE-DNA adduct 的移除能力, 以便更進一步的說明麩胱甘肽轉移酶-M2 確實有移除 BPDE 傷害的能力。

#### 結果:

本研究先從 RNA 的層次探討; 首先將 H1355 細胞株前處理 4  $\mu$ M 的 actinomycin D, 因為 actinomycin D 可抑制新合成的

RNA; 待 1 小時後再接著加入不同濃度的 BPDE; 共同處理 4 小時後萃取細胞的 RNA, 並以 nested RT-PCR 分析 MDM2 mRNA 的表現情形。結果顯示於圖一 當 H1355 細胞處理 BPDE 可有效誘發 MDM2 mRNA 發生選擇性短小變異 (MDM2-732), 而當 H1355 細胞預先處理 actinomycin D 後, 可有效的抑制 MDM2 mRNA 發生選擇性短小變異。結果說明了選擇性短小變異的 MDM2 mRNA 是發生在新合成的 RNA 層次。

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 (21, 22), 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 (MRC-5、WI-38 及 Beas-2B) 與肺癌細胞株 (H1299、H1355、A549 及 A427), 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。於圖二 A 顯示, 正常的肺細胞株中普遍均可以表現 GST-P1、M1、M2 與 M4, 而 GST-P1 在肺癌細胞中也有大量表現的情形, 此結果亦與前人的研究相符 (23-25)。值得注意的是, 在 H1355 細胞內僅表現 GST-M4 基因, 而 GST-A 在正常與肺癌細胞中並沒有表現。

圖二 A 的結果顯示, H1355 細胞內僅表現 GST-M4, 而正常肺細胞中可表現 GST-P1、M1、M2 與 M4, 其他肺癌細胞中亦有 GST-P1 大量的表現情形。因此, 本研究亦針對這些細胞進行 GST 的酵素活性分析; 以進一步確定細胞中所表現之不同類型的 GST mRNA level 是否與酵素活性的強弱有關。對照圖二 A 與 B 的結果, 本研究發現在所有分析的細胞中僅有 MRC-5 與 A549 表現較高的 GST 酵素活性, 其活性分別為 1.36  $\mu$ moles/min-mg 與 1.78  $\mu$ moles/min-mg; 而 MRC-5 細胞中則有 GST-P1、M2 與 M4 的 mRNA 表現, A549



細胞則是表現很高量的 GST-P1 mRNA。至於 H1355 細胞的 GST 酵素活性表現僅有 0.048  $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ，而 RT-PCR 分析的結果也顯示 H1355 細胞中只有少量的 GST-M4 mRNA 表現。

有鑑於圖二 A.與 B.的結果，正常的肺細胞株 MRC-5 表現較高的 GST 酵素活性，同時 MTS assay 的結果也發現 MRC-5 細胞暴露 BPDE 時有較高的存活率。因此本研究進一步選用 MRC-5 及 H1355 細胞株，並將細胞處理 BPDE，再以 nested RT-PCR 分析 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異的情形，藉以評估兩株細胞對於 BPDE 毒性的感受性差異。將 MRC-5 及 H1355 細胞株分別處理 2  $\mu\text{M}$  的 BPDE，待四小時後發現 BPDE 會使 H1355 細胞中的 *MDM2* mRNA 發生選擇性短小變異；然而在 MRC-5 細胞株卻沒有類似的情形發生(圖三)，甚至處理 BPDE 超過 24 小時，依然不會有選擇性短小變異的情形 (data not shown)。

本研究發現 MRC-5 細胞可有效的抵抗經由 BPDE 所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異發生，而 RT-PCR 與 GST 酵素活性分析也發現 H1355 細胞內僅表現 GST-M4，同時 GST 酵素活性也偏低；因此本研究進一步假設細胞內的 GST 表現與 BPDE 是否誘發 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異發生有關。目前的研究大多針對 GST-P1 或 GST-M1 於肺部組織中的基因多型性分析，然而對於 GST-M2 於肺部組織中的研究並不深入；為了要探討 GST-M2 的酵素活性是否會影響個體之間對於 BPDE 傷害的感受性，因此本研究進一步將 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。首先，本研究分析 MRC-5、H1355 細胞株及短暫轉染 GST-M2 至 H1355 細胞內的 GST 蛋白表現程度。利用謝易修教授實驗室所製備的 GST-Mu 專

一性抗體偵測細胞中 GST-Mu 家族的總蛋白表現量，發現 MRC-5 細胞相較於 H1355 細胞可表現較高量的 GST-Mu 蛋白，同時將 MRC-5 細胞中表現的 GST-M2 轉染至 H1355 細胞株也可以大量蛋白(圖四 A)。此外，進一步以專一性辨認 FLAG 片段的抗體與 GST-Mu 專一性抗體分析可穩定表現 GST-M2 或 GST-M4 的 H1355 細胞株，發現兩株細胞均可大量的表現 GST-M2 或 M4 蛋白(圖四 B.)。

利用西方轉漬法已證實先前所構築之 GST-M2 及 M4 可大量表現蛋白產物於 H1355 細胞株；因此進一步的分析其在 H1355 細胞株內的活性表現。本研究利用 CDNB 做為受質來偵測細胞中的 GST-M2 或 GST-M4 酵素活性，發現可穩定表現 GST-M2 的 H1355 細胞株，其活性高達 18.7  $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ；而表現內生性 GST-M4 的 H1355 細胞株僅表現 0.043  $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 。此外，若將現 GST-M4 過量表現於 H1355 細胞株，其 GST 酵素活性也僅有 0.48  $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ，而祇有轉染載體的對照組則 GST 酵素活性只有 0.23  $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 。

前人的研究已證實，GST-P1 可有效的降低 BPDE 所造成 DNA damage (26)；但對照本研究的結果卻也發現，即便肺癌細胞中表現高量的 GST-P1 卻仍舊無法阻止內生性的 *MDM2* mRNA 發生選擇性短小變異。本研究初步發現 H1355 細胞在處理 B[a]P 或 BPDE 後可誘發 *MDM2* mRNA 的選擇性短小變異；而 MRC-5 細胞卻可抵抗 B[a]P 或 BPDE 所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異，因此本研究進一步將 GST-M2 或 GST-M4 基因穩定表現於 H1355 細胞株，希望能藉由穩定表現 GST-M2 蛋白於 H1355 細胞而有效減少 BPDE 所造成的 DNA 傷害並延緩 *MDM2* mRNA 發生選擇性短小變異。本研究將穩定表現 GST-M2 或 empty-vector 的 H1355 細胞株及 H1355 細胞株分別處理 2  $\mu\text{M}$  之 BPDE，待 4 小時後以 nested RT-PCR 分析

*MDM2* mRNA 的表現情形。圖五.的結果顯示，穩定表現 GST-M2 之 H1355 細胞株可有效的延緩 *MDM2* mRNA 發生選擇性短小變異，但是在穩定表現 GST-M4 或 empty-vector 的 H1355 細胞株卻可明顯的偵測到選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 表現。因此，本研究證實當 GST-M2 大量表現的情形下可有效的延緩經由 BPDE 所誘發之 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異，但 GST-M4 卻無相同的功能。

先前的研究已經證實，穩定表現 GST-M2 可有效的減緩 BPDE 所誘發之 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異；因此本研究進一步利用競爭性 ELISA 分析來評估在穩定表現 GST-M2 酵素活性的情形下是否可減少經由 BPDE 所造成的 DNA 傷害。為了要更加的確定 GST-M2 在減緩 BPDE 造成之 DNA 傷害過程中所扮演的角色，本次實驗同時選用兩株穩定表現不同程度的 GST-M2 酵素活性之 H1355 細胞株 (clone-1-表現的 GST 酵素活性為  $3.46 \mu \text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$  與 clone-4-表現的 GST 酵素活性為  $14.78 \mu \text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ )，及穩定表現 GST-M4 或 empty-vector 的 H1355 細胞株來作為本次實驗的對象。在各別處理不同濃度的 BPDE ( $0.5$ 、 $1$ 、 $2 \mu \text{M}$ )後 24 小時，萃取細胞的 genomic DNA 並以競爭性 ELISA 分析細胞中的 BPDE 與 DNA 鍵結物的含量，藉以評估細胞所受到的傷害程度。結果顯示，於穩定表現 GST-M2 的 H1355 細胞中 (clone-1 與 clone-4)，DNA 與 BPDE 形成之鍵結物表現量會隨著 BPDE 的劑量增加而被抑制；而於穩定表現 GST-M4 或 empty-vector 的 H1355 細胞內，DNA 與 BPDE 形成鍵結物含量則隨著暴露劑量的增加而上升 (圖六)。在穩定表現 GST-M4 的 H1355 細胞中，暴露 BPDE- $2 \mu \text{M}$  可在細胞內形成之 DNA 與 BPDE 鍵結物的含量高達  $62 \text{ adducts}/10^8 \text{ nucleotides}$ ；在此同時穩定表現 GST-M2 的 H1355 細胞 (clone-1 與 clone-4)卻分別僅有  $48$  與  $36.8 \text{ adducts}/10^8 \text{ nucleotides}$ ，證明了 GST-M2 的酵素活性表現高低和 DNA

與 BPDE 形成鍵結物含量有絕對的關係。在暴露 BPDE 的第 24 小時，穩定表現 empty-vector 的 H1355 細胞株內的 DNA 與 BPDE 鍵結物含量高於穩定表現 GST-M2 的 H1355 細胞株 (clone-4)約 1.41 倍 (處理  $2 \mu \text{M}$  之 BPDE)及 2.54 倍 (處理  $1 \mu \text{M}$  之 BPDE)。

#### 討論：

研究顯示，暴露外來化學物質會造成 DNA 傷害並導致多種基因上的缺失；同時也會加速正常細胞的生長並使細胞朝向惡質化 (27)。目前的研究結果指出，Glutathione S transferase 對於 BPDE 造成的傷害扮演一重要保護角色 (15, 28)；因此 GST 在毒物學的領域及其潛在的生理功能是值得深入探討與研究。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制一定能發展更有效的機制來對抗任何可能造成 DNA 傷害的化學暴露。

一般而言，肺癌病人的組織除了可以發現 p53 基因突變或不表現之外，GST 的基因多型性也被認為是肺癌發生的潛在危險因子 (22)。除此之外，柯俊良教授先前的研究也發現若肺癌病人組織中表現 *MDM2* mRNA 會有較高的存活率 (29)；而本研究室與李輝教授研究室共同的發現卻指出，26.4%的肺癌病人組織中有 *MDM2* mRNA 發生選擇性短小變異的情形，而抽煙與 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異的發生有密切的關聯。Sigalas 等人首先於 1996 年提出，短小的 MDM2-B 會促使癌細胞轉形並加速癌症的惡質化 (30)，而最近的研究也證實 MDM2-B 可使老鼠發生腫瘤 (31)；因此本研究進一步探討香菸中的多環芳香烴暴露、*MDM2* mRNA 選擇性短小變異與 GST 酵素活性表現三者之間的關係。

雖然動物模式的研究已證實暴露香菸中的毒性物質會引起肺癌的發生，而抽煙一直以來都被認為是造成人類肺癌發生的主要因子，但都僅限於流行病學上的探討。因此，本研究首先以細胞模式來證實香菸中的多環芳香烴暴露與 *MDM2* mRNA

選擇性短小變異之間的關連，並探討其相關的調控機轉。本研究初步將 H1355 細胞株處理了不同類別的香煙中多環芳香煙，發現其中的 B[a]P 與其最終的代謝產物 -BPDE 會誘發選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 表現。進一步將這兩種香菸致癌物處理不同濃度於 H1355 細胞株，再於暴露後的 4 小時利用 nested-PCR 分析 H1355 細胞的 *MDM2* mRNA 表現，發現可誘發 3 種選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 表現，而令人驚訝的是其中的一種選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 與先前自軟組織腫瘤 (soft tissue sarcoma) 中發現的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異型態是一樣的 (32)；但在肺癌細胞中被發現卻是第一次，而另外兩種形式的 *MDM2* 則是第一次在本研究提出。本研究中發現 H1355 細胞處理 B[a]P 或 BPDE，發現可誘發 *MDM2* mRNA 的選擇性短小變異，同時將處理的時間由 4 小時拉長到 24 小時亦發現同樣會有選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 的誘發；相同的實驗在重複多次之後發現在處理 BPDE-2  $\mu$  M 的劑量下均可有效的誘發 *MDM2*-732 的表現，而處理 B[a]P 雖然也可誘發 *MDM2* mRNA 發生選擇性短小變異，但表現的類型並不固定。事實上，在 intronic sequence 中的 splice junction 部位有 99.24% 是屬於 5'GT---AG3' 的類型；而 spliceosome 可藉由辨識並結合到這種特殊的序列來調控 splicing 的發生 (33)。而本研究推測 spliceosome 可能隨機的結合到 *MDM2* 序列中具有 5'GT---AG3' 特徵的 splice junction，進而調控基因的 splicing。此外，先前的研究也發現 spliceosome 亦可結合到具有 5'AT---AC3' 特徵的 splice junction (34)；而當細胞受到刺激時，human SR protein 可被磷酸化並參與 splicing 的調控而影響 splicing 發生的位置 (35, 36)。因此，本研究推測實驗中由暴露 BPDE 或 B[a]P 所誘發表現選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA，可能是透過上述的機制使得 spliceosome 隨機的結合到 splice junction 部位特殊的序列上，而這些選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 可能就是由這

些受到 DNA damage 影響的 spliceosome 所產生；雖然這些受到影響的基因在細胞內可藉由 DNA repair 機制進行修復或移除，但仍然有少數受影響的基因被保留下來，而這些極少數的基因在透過 nested RT-PCR 增幅之後即可被發覺，而這類的情形亦有可能發生在基因序列中的 exonic splicing elements。

研究指出，當細胞處理 benzo[a]pyrene 會引起 DNA 的傷害進而造成細胞週期的停滯，同時也會促進 *MDM2* mRNA 的表現量增加 (37, 38)。目前已知香菸中含有許多致突變的物質，而這些致突變物的代謝物會與 DNA 發生反應造成 DNA 鍵結物 (DNA-adducts)；進而影響基因的表現而造成肺癌的發生 (39, 40)。由附表一與附表二的結果顯示香菸對於 *MDM2* mRNA 的選擇性短小變異發生具有潛在的影響力，而本研究初步的結果已證實香菸中的 B[a]P 及其最終的代謝產物 BPDE 會造成 *MDM2* mRNA 的選擇性短小變異。事實上，在人類的肝細胞也曾發現類似的情形，當肝細胞處理 17  $\beta$ -estradiol 或 17  $\alpha$ -ethinylestradiol 可誘發選擇性短小變異型態的 *MDM2* mRNA 表現，而 17  $\beta$ -estradiol (E2) 已證實會調控數種人類的致癌基因與抗癌基因表現 (41)。本研究發現經由 BPDE-2  $\mu$  M 刺激所得到之選擇性短小變異型態的 *MDM2* mRNA (*MDM2*-732) 與先前自軟組織腫瘤 (soft tissue sarcoma) 中所發現的 *MDM2*-KB2 序列是一樣的 (32)，但發現於肺癌細胞株卻是第一次，因此本研究相信這種經由 BPDE 刺激所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異在肺癌的發生過程中扮演相當重要的角色，同時本研究也是第一個證明香菸中的致癌物質會誘發選擇性短小變異型態的 *MDM2* mRNA 表現。

#### 參考文獻

1. Connelly, M. A.; Zhang, H.; Kieleczawa,

- J.; Anderson, C. W., Alternate splice-site utilization in the gene for the catalytic subunit of the DNA-activated protein kinase, DNA-PKcs. *Gene* **1996**, 175, (1-2), 271-3.
2. Mannino, J. L.; Kim, W.; Wernick, M.; Nguyen, S. V.; Braquet, R.; Adamson, A. W.; Den, Z.; Batzer, M. A.; Collins, C. C.; Brown, K. D., Evidence for alternate splicing within the mRNA transcript encoding the DNA damage response kinase ATR. *Gene* **2001**, 272, (1-2), 35-43.
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.; Jansson, 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.; Jansson, 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. 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.
16. Comstock, K. E.; Widersten, M.; Hao, X. Y.; Henner, W. D.; Mannervik, B., A comparison of the enzymatic and physicochemical properties of human glutathione transferase M4-4 and three other human Mu class enzymes. *Arch Biochem Biophys* **1994**, 311, (2), 487-95.
17. 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.
18. Armstrong, R. N., Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **1997**, 10, (1), 2-18.
19. 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.
20. Habig, W. H.; Jakoby, W. B., Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* **1981**, 77, 398-405.
21. 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.
22. Reszka, E.; Wasowicz, W.; Rydzynski, K.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Szymczak, W., Glutathione S-transferase M1 and P1 metabolic polymorphism and lung cancer predisposition. *Neoplasma* **2003**, 50, (5), 357-62.
23. 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.
24. 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.
25. Comstock, K. E.; Johnson, K. J.; Rifken, D.; Henner, W. D., Isolation and analysis of the gene and cDNA for a human

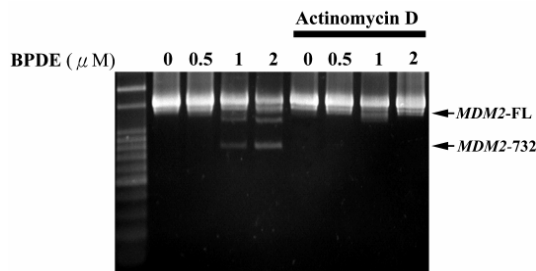
- Mu class glutathione S-transferase, GSTM4. *J Biol Chem* **1993**, 268, (23), 16958-65.
26. Hu, X.; Herzog, C.; Zimniak, P.; Singh, S. V., Differential protection against benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced DNA damage in HepG2 cells stably transfected with allelic variants of pi class human glutathione S-transferase. *Cancer Res* **1999**, 59, (10), 2358-62.
27. Harris, C. C., Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* **1991**, 51, (18 Suppl), 5023s-5044s.
28. 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.
29. Ko, J. L.; Cheng, Y. W.; Chang, S. L.; Su, J. M.; Chen, C. Y.; Lee, H., MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* **2000**, 89, (3), 265-70.
30. Sigalas, I.; Calvert, A. H.; Anderson, J. J.; Neal, D. E.; Lunec, J., Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med* **1996**, 2, (8), 912-7.
31. Steinman, H. A.; Burstein, E.; Lengner, C.; Gosselin, J.; Pihan, G.; Duckett, C. S.; Jones, S. N., An alternative splice form of Mdm2 induces p53-independent cell growth and tumorigenesis. *J Biol Chem* **2004**, 279, (6), 4877-86.
32. Bartel, F.; Meye, A.; Wurl, P.; Kappler, M.; Bache, M.; Lautenschlager, C.; Grunbaum, U.; Schmidt, H.; Taubert, H., Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. *Int J Cancer* **2001**, 95, (3), 168-75.
33. Burset, M.; Seledtsov, I. A.; Solovyev, V. V., Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* **2000**, 28, (21), 4364-75.
34. Tarn, W. Y.; Steitz, J. A., Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem Sci* **1997**, 22, (4), 132-7.
35. Ge, H.; Manley, J. L., A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* **1990**, 62, (1), 25-34.
36. Zahler, A. M.; Neugebauer, K. M.; Lane, W. S.; Roth, M. B., Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **1993**, 260, (5105), 219-22.
37. Hsing, A.; Faller, D. V.; Vaziri, C., DNA-damaging aryl hydrocarbons induce Mdm2 expression via p53-independent post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* **2000**, 275, (34), 26024-31.
38. Vaziri, C.; Faller, D. V., A benzo[a]pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53-independent G1 arrest in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **1997**, 272, (5), 2762-9.
39. Hirao, T.; Nelson, H. H.; Ashok, T. D.; Wain, J. C.; Mark, E. J.; Christiani, D. C.; Wiencke, J. K.; Kelsey, K. T., Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce

chromosome loss at 3p21 in lung cancer. *Cancer Res* **2001**, 61, (2), 612-5.

40. Pfeifer, G. P.; Denissenko, M. F.; Olivier, M.; Tretyakova, N.; Hecht, S. S.; Hainaut, P., Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* **2002**, 21, (48), 7435-51.

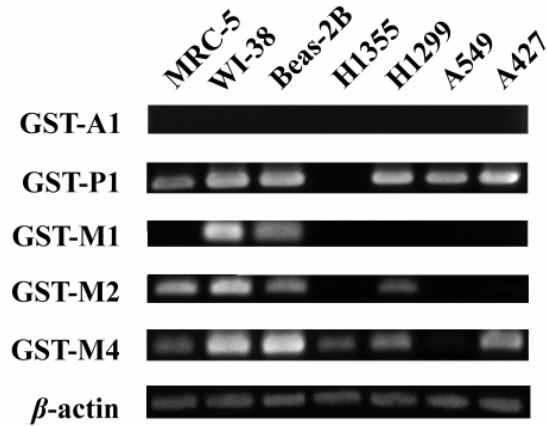
41. Schlott, T.; Thasler, W.; Gorzel, C.; Pahernik, S.; Brinck, U.; Eiffert, H.; Droese, M., Detection of MDM2 alterations in cultured human hepatocytes treated with 17beta-estradiol or 17alpha-ethinylestradiol. *Anticancer Res* **2002**, 22, (3), 1545-51.

圖表說明

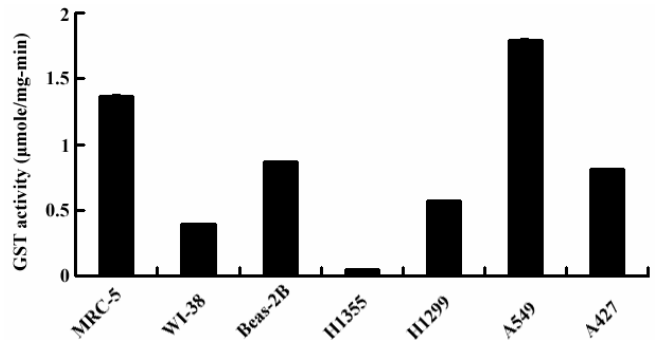


圖一 以 Actinomycin D 抑制 de novo RNA synthesis 可減緩處理選擇性短小變異的 *MDM2* mRNA 表現。將 H1355 細胞處理不同濃度的 BPDE 或預先處理 4  $\mu$ M 的 Actinomycin D，待 1 小時後再共同處理不同濃度的 BPDE，於 4 小時後萃取 mRNA 並利用 nested RT-PCR 分析 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異的表現情形，1476-bp 顯示為完整片段的 *MDM2* mRNA 表現。Nested RT-PCR 分析結果顯示處理 4  $\mu$ M 的

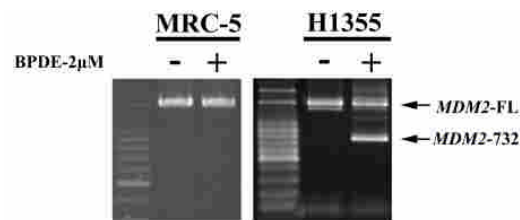
Actinomycin D 可有效的抑制選擇性短小變異型態的 *MDM2* mRNA 表現。



圖二 A. 利用 RT-PCR 分析正常及肺癌細胞株之 GST 基因表現。以專一性 primer 區分細胞內表現何種類型的 GST。

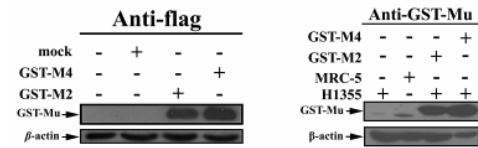


圖二 B. 分析正常及肺癌細胞株之麩胱甘肽轉移酶(GST)酵素活性表現。本研究之測定方法參照 Habig 等人所發表之方法進行，而研究結果由獨立3次重複的結果所得。

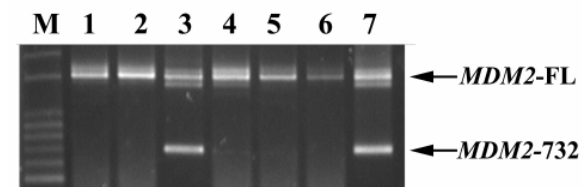


圖三、MRC-5 細胞可抵抗 BPDE 所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異；當 H1355 及 MRC-5 細胞處理 BPDE-2  $\mu$ M 後 4 小時，萃取細胞的 RNA 並合成 cDNA 以進行 nested RT-PCR 分析 *MDM2* 基因表現。PCR 產物以 1% 洋菜膠分析並以 ethidium bromide 染色，最後利用紫外光觀察；結果顯示處理 BPDE-2  $\mu$ M 會誘發

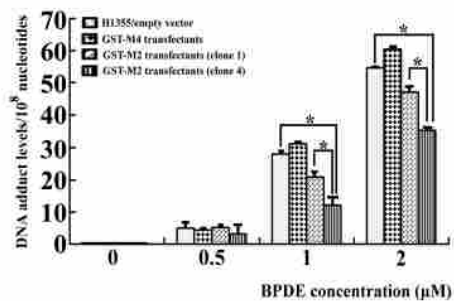
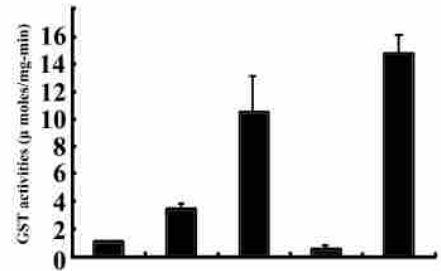
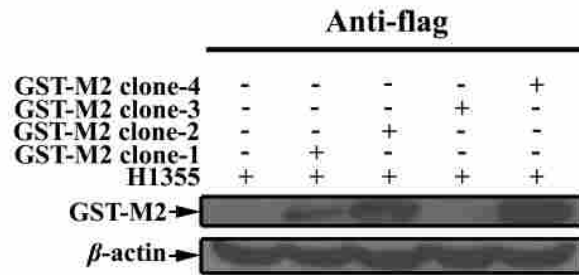
H1355 細胞內之 *MDM2* 基因發生選擇性短小變異，但 MRC-5 細胞內並無相同的情形發生。完整的 *MDM2* (*MDM2* FL) 基因片段大小為 1476 bp。



圖四. 以西方點墨法分析穩定表現 GST-M2 與 M4 之 H1355 細胞內的 GST 蛋白表現；取 50  $\mu$ g 的細胞蛋白萃取物並利用 15% 的 SDS PAGE 進行分析，最後以辨識 FLAG 片段之專一性抗體或辨識 GST-Mu 之專一性抗體偵測蛋白表現，藉以區分內源性及外源性的 GST 蛋白表現。



圖五 穩定表現 GST-M2 於 H1355 細胞株可有效延緩經由處理 BPDE 所誘發的 *MDM2* mRNA 選擇性短小變異；將穩定表現 GST-M2、empty vector 之 H1355 細胞株及未轉染之 H1355 細胞處理 BPDE-2  $\mu$ M，待 4 小時後以 nested RT-PCR 分析 *MDM2* mRNA 表現情形。Lane 1 表示未處理 BPDE 之 H1355 細胞，Lane 2 表示 H1355 細胞處理 DMSO 做為 solvent control，Lane 3 表示 H1355 細胞處理 BPDE (2  $\mu$ M)，Lane 4 表示穩定表現 GST-M2 之 H1355 細胞株處理 BPDE-2  $\mu$ M；Lane 5 表示未處理 BPDE 之穩定表現 GST-M2 細胞株，Lane 6 表示未處理 BPDE 之穩定表現 empty vector 之 H1355 細胞株，Lane 7 表示穩定表現 empty vector 之 H1355 細胞株處理 BPDE-2  $\mu$ M。Nested RT-PCR 結果顯示處理 BPDE-2  $\mu$ M 會誘發 *MDM2* 基因發生選擇性短小變異情形。



圖六. 以競爭性 ELISA 分析細胞中 BPDE 與 DNA 鍵結物含量；首先以西方轉漬法分析先前構築之穩定表現 GST-M2 基因的 H1355 細胞株內之 GST-M2 蛋白表現，同時也分析其 GST-M2 的酵素活性；接著選用其中兩株穩定表現不同程度之 GST-M2 的 H1355 細胞株 (clone-1 與 clone-4) 與穩定表現 empty-vector 或 GST-M4 的 H1355 細胞株，分別處理不同濃度的 BPDE (0.5、1 及 2  $\mu$ M)，待 24 小時後萃取 genomic DNA 並分析細胞內 BPDE 與 DNA 鍵結物的含量。本研究以三重複的方式定量分析單一 BPDE 濃度下之 BPDE 與 DNA 鍵結物含量，並將結果平均以求得標準差，\* 表示此結果具有統計上的意義，其誤差值小於 0.001。