

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣女性肺癌對環境污染物之 DNA 傷害易感性之機轉研究
(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-032-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學毒理學研究所

計畫主持人：李輝

計畫參與人員：賴吉慶, 简 ; 孝城

報告類型：完整報告

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 93 年 11 月 3 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

台灣女性肺癌對環境污染物之 DNA 傷害易感性之機轉研究 (3/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 92-2320-B-040-017
執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：李 輝
共同主持人：
計畫參與人員：賴吉慶、簡孝城

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：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

中 華 民 國 93 年 10 月 31 日

(一)中文摘要

關鍵詞: 肺癌、雌性素受體、細胞色素 P450 1A1

本研究室過去研究發現，不抽菸之女性肺癌患者之 DNA adduct levels 顯著高於不抽菸之男性，且此現象無法以參與代謝 CYP1A1, GSTM1 之基因多行性來解釋。為了解其可能原因，在過去三年之計畫中，分別由腫瘤組織以及細胞實驗探討其機轉。首先在肺腫瘤組織中發現不抽菸女性肺癌患者之 CYP1A1 mRNA 之表現顯著高於不抽菸男性，顯示女性 DNA adduct levels 高可能與 CYP1A1 有較高之轉錄活化。另外發現女性肺癌患者之 ER 發生 hypermethylation 之頻率遠低於男性，顯示 ER 在女性表現之頻率較高。在細胞轉染 ER 至肺癌細胞的實驗，以 western blot 和 Gel shift assay，結果都顯示 ER 轉植確實能促進 AhR 與 Arnt 結合，進而促進 CYP1A1 的轉錄。而在 siRNA 方法降低 ER 在肺癌細胞表現之實驗則發現，CYP1A1 蛋白表現量顯著低於 ER 沒有降低的原株肺癌細胞，同樣以 Gel shift assay 亦證明 ER 被降低的細胞之 AhR 與 Arnt 結合 XRE 之能力有顯著降低的現象。在肺細胞中，ER 會促進 AhR 的活化，進而促進 CYP1A1 之轉錄。因此女性肺癌有較高之 DNA adduct levels 可能是女性有較高機會表現 ER 在肺癌組織中，會經由 ER 與 AhR 之交互作用，而活化主要參與代謝多環芳香烴之 CYP1A1 的轉錄。而在腫瘤組織中又發現女性有較高之 CYP1A1 之表現，且與其 DNA adduct levels 相關，總之，本計畫由肺腫瘤組織與細胞實驗的結果都能印證女性有較高之 DNA 傷害易感性是經由 ER 與 AhR 交互作用所致。

Abstract:

Keywords: lung cancer, estrogen receptor, CYP1A1

Our previous studies had indicated that the DNA adduct levels in nonsmoking female lung cancer patients were significantly higher than those in nonsmoking male lung cancer patients. The high adduct levels can not be explained by their genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 that had been shown to be associated with DNA adduct formation. To elucidate the molecular mechanisms, lung tumors and cell culture experiments were performed to understand whether the cross talk between estrogen receptor (ER) and arylhydrocarbon receptor (AhR) was involved in activation of CYP1A1 transcription to cause high DNA adduct levels in female lung cancer patients. In lung tumor experiments, CYP1A1 mRNA expressions and DNA adduct levels in adjacent normal lung tissues from lung cancer patients were evaluated by RT-PCR and ³²P-postlabeling, respectively. Our data indicated that CYP1A1 mRNA expression levels in female lung cancer patients were significantly higher than those in male lung cancer patients. In addition, CYP1A1 mRNA expression levels were correlated with DNA adduct levels. On the other hand, MSP data showed that ER hypermethylation in male lung cancer patients was greater than that in female lung cancer patients. Namely, a higher frequency of ER expression in female lung cancer patients compared with male lung cancer patients. In cell culture experiments, we first transfected ER into lung cancer A549 cells and found CYP1A1 protein levels were up-regulated compared with those of parental cells and gel shift assay data indicated that AhR-Arnt complex was significantly increased in ER transfected cells. We also used small interference RNA to knockdown ER expression in lung cancer CL-5 cells because the cell had a relatively high ER expression. Western blot data showed that CYP1A1 protein expression levels was sharply decreased in three ER-knockdown cell clones compared with that of parental cells. Additionally, AhR-Arnt complex was also significantly attenuated in ER-knockdown cell clones from gel-shift assay. These results

from cell culture experiments strongly indicated that unliganded ER expression may be cross-talk with AhR to promote liganded AhR nuclear translocation to form AhR-Arnt complex binding in XRE and then up-regulated of CYP1A1 transcription. The cross-talk mechanism of AhR and ER provide to explain why a higher frequency of ER expression in nonsmoking female lung cancer patients had a higher susceptibility to DNA damage derived from environmental carcinogen exposure. Thus, accumulation of higher DNA damage may be linked with lung tumorigenesis of nonsmoking female lung cancer patients in Taiwan.

目 錄

(二)、報告內容	6
一、前言	6
二、研究目的	8
三、文獻探討	9
四、研究方法	15
五、結果	23
六、討論	27
七、參考文獻	29
八、表與圖	37
九、計畫成果自評	45

(二)報告內容：

一、前言

肺癌是台灣女性癌症死亡之首要原因。本研究室一直有興趣探討不抽菸之台灣婦女，為何會有罹患肺癌之高危險性？本研究室過去已發現肺組織具有較高 DNA adduct levels 是引起肺癌之重要危險生物指標(Cheng et al., 2000)。又發現不抽菸之女性肺癌患者之肺組織之、benzo[a]pyrene (BaP)-like DNA adducts 含量顯著高於男性患者(Cheng et al., 2001)。若由台灣女性對環境污染物所造成之 DNA 傷害的易感性，似乎可部分解釋為何會有罹患肺癌之高危險性。過去研究已知 DNA 鍵結物的形成與參於代謝活化之 CYP1A1 之表現，解毒基因 GSTM1 以及 DNA 修補基因等三類基因之表現有關。其中尤其與 CYP1A1 基因之調控有直接相關。在肺癌研究上，已發現抽煙女性肺癌患者肺組織中有較高之 DNA adduct levels，且其 DNA adduct levels 與 CYP1A1 mRNA 的表現有正相關性。因此推測女性有較高之 DNA adduct levels 可以 CYP1A1 表現較高來解釋 (Mollerup et al. 1999)。但是為何有較高之 CYP1A1 的基因表現大多解釋與女性荷爾蒙有關，但是其作用機轉至今未明。

流行病學研究顯示月經經期短於 26 天和停經後之婦女較易罹患肺癌，這顯示血液含有低濃度之雌性素(Estrodiol, E2)可能和肺癌發生有關。因此推測低環境暴露之不抽菸，又具有低濃度 E2 之婦女肺組織之 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)和 Estrogen receptor(ER)兩條訊號路徑之交互作用(cross talk)，可能參與 CYP1A1 基因之轉錄活化。有關 AhR 與 ER 兩條訊號路徑間之交互作用大多在乳癌細胞中被發現。都顯示環境污染物，例如 TCDD, BaP 等都會促進 ER 之 proteosomal degradation。因此大多著重於污染物會引起內分泌之調控失調。有報告發現 E2 會抑制 AhR 之活化，而降低 CYP1A1 之表現，但有的細胞 E2 則沒有影響，似乎不同細胞有不同的反應。由於大多女性肺癌好發於停經年齡，因此推測在沒有或是很低生理濃度之 E2 之狀態下，肺癌細胞中 ER 與 AhR 之交互作用可能不同於乳癌細胞。但在肺癌細胞中 ER 與 AhR 之間之交互作用是否會影響 CYP1A1 之轉錄活化，而增加 DNA

adduct levels? 則至今未明，因此本計畫將提出其間之作用機轉，以解釋為何女性對
污染物有較高之感受性。

二、研究目的

肺癌是台灣女性癌症死亡之首要原因。本研究室發現不抽菸之女性肺癌患者之肺組織之、benzo[a]pyrene (BaP)-like DNA adducts 含量顯著高於不抽菸男性患者 (Cheng et al., 2001)。且抽煙與否與台灣肺癌患者之 DNA adduct 無關，這顯示環境污染物貢獻度不亞於抽煙。過去研究已發現抽煙女性肺癌患者肺組織中有較高之 DNA adduct levels，且其 DNA adduct levels 與 CYP1A1 mRNA 的表現有正相關性 (Mollerup et al. 1999)。而台灣女性肺癌有較高之 DNA adduct levels 並非由抽煙引起，因此其分子作用機轉可能不同於抽煙。但無論如何與參與多環芳香烴代謝活化之 CYP1A1 之轉錄活化有關。由於主要在探討女性肺癌之 DNA 傷害之易感性，因此必須考慮為何血液含有低濃度之雌性素(Estrodiol, E2)時 unliganded ER 與調控 CYP1A1 之 AhR signaling pathway 之間的交互作用。因此推測低環境暴露之不抽菸，又具有低濃度 E2 之婦女肺組織之 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)和 Estrogen receptor(ER)兩條訊號路徑之交互作用(cross talk)，可能參與 CYP1A1 基因之轉錄活化。因此推測在沒有或是很低生理濃度之 E2 之狀態下，肺癌細胞中 ER 與 AhR 之交互作用可能不同於乳癌細胞。但在肺癌細胞中 ER 與 AhR 之間之交互作用是否會影響 CYP1A1 之轉錄活化，而增加 DNA adduct levels？則至今未明，因此本計畫將提出其間之作用分子機轉，以解釋為何女性對污染物有較高之感受性。這些結果將有助於釐清為何不抽煙之女性肺癌具有較高之 DNA adduct levels？這即是本計畫研究之主要目的。

三、文獻探討

一、肺癌與流行病學的研究

肺癌依組織學，通常可分為兩大類，即小細胞肺癌(small cell lung carcinoma, SCLC)與非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)。小細胞肺癌多發生於男性，且與抽煙息息相關，約佔全部肺癌的 12%到 25%。小細胞肺癌生長速度很快，且癌細胞容易擴散轉移到其他器官。非小細胞肺癌比小細胞肺癌常見，約佔全部肺癌的 77%到 88%。非小細胞肺癌的生長和擴散轉移的速度都較小細胞肺癌為慢。非小細胞肺癌依腫瘤細胞的型態又可分成三種：肺腺癌 (Adenocarcinoma)、鱗狀上皮細胞癌 (Squamous cell carcinoma)及大細胞癌 (Large cell carcinoma)三類。

根據衛生署統計資料顯示，自民國七十一年以來，惡性腫瘤一直是國內十大死亡原因的第一位(衛生署，生命統計，1984-1999)。1955 年男性與女性中，每十萬人口中分別有 2.67 人和 1.25 人是因肺癌而導致死亡。1996 年男性與女性肺癌死亡率已達每十萬人有 34.87 人及 15.30 人。十年之間肺癌死亡率已增加了十二至十三倍，是惡性腫瘤所造成之死亡數中增加速度最為顯著的一種癌症。由流行病學的結果顯示，男性肺癌死亡率的上升趨勢至 1980 年代初期即開始漸緩，但女性肺癌死亡率卻仍繼續大幅上升。自 1950 年至 1994 年之間，女性肺癌的死亡率增加了五倍，而同期男性僅增加兩倍 (American Cancer Society，1994)。Valaitis 等人指出(1981)，從 1963-1967 至 1974-1976 的十年之間，罹患肺腺癌的人數突然增加了許多，其原因可能是女性罹患肺癌的比率從 19%增加至 31%。且女性罹患肺腺癌的比率較其他型態的肺癌的罹患率為高，以至於罹患肺腺癌的人數急速增加。至 1987 年肺癌死亡率已超過乳癌，成為美國女性第一位癌症死亡的原因 (Ernster，1994)。在台灣地區，自 1973 年開始至今，肺癌一直是女性癌症死亡的第一大死亡原因原因。因此研究台灣地區肺癌發生，尤其是女性肺癌之致病因子和肺癌形成機轉是當前非常重要之研究課題。

二、DNA 鍵結物與肺癌

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)是廣泛存在環境中的污染物。PAHs 主要吸附

在空氣懸浮微粒表面，通常能進入呼吸系統的懸浮微粒之直徑大多小於 10 μm (Gerde *et al* , 1991a ; 1991b ; 1991c) , PAHs 除了可經由呼吸道進入體內之外，亦可經食物攝取及皮膚接觸進入體內。進入體內的 PAHs 會經生物轉換作用 (biotransformation) 將其代謝成 diol epoxide 型的代謝產物 (Sims *et al* , 1974) 並與 DNA 鍵結，形成共價結合的 DNA 鍵結物。

世界衛生組織 (WHO) 曾分析大都會地區空氣懸浮微粒中的 PAHs 成份，結果發現含有高濃度的 PAHs，其中 B[a]P 的濃度為 $10 \text{ ng} / \text{m}^3$ 。B[a]P 是典型具有致癌性的 PAH 化合物。其主要代謝活化之路徑包括三個路徑進行：(1) 經 Mixed - Function Oxidase--主要是細胞色素 P450 (cytochrome P450) 的作用，在 B[a]P C7, C8 位置氧化成 7,8-epoxide，(2) 經 epoxide hydroxylase (EH) 將 7,8-epoxide 水解成 (-)trans-7,8 - diol，(3) 再經細胞色素 P450 的作用，在 (-)trans-7,8-diol 的 C9，C10 進行氧化作用生成 r7-t-8-dihydroxy-t9,10-epoxy-7,8,9,10- tetrahydro- benzo[a]pyrene (diolepoxide I) r7-t-8- dihydroxy-c9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene (diol epoxide II)，即為 BPDE。而 BPDE 會經由與 DNA 形成鍵結物，造成基因的轉換突變 (transversion mutation)，對細胞有較強的致突變性和致腫瘤性 (Slaga *et al* , 1979 ; Thakker *et al* , 1985)。已知抽煙是導致肺癌形成的主要危險因子。又知香煙含有大量的 PAHs (IARC , 1986)。許多報告指出，對吸煙之肺癌患者之肺組織和支氣管所測得之 PAH-DNA 鍵結物的含量和吸煙量有很好的線性關係 (Phillips *et al* , 1988 ; Randerath *et al* , 1989 ; Garner *et al* , 1990 ; Jones *et al* , 1993)。Risch 等人 (1993) 的流行並學之研究結果顯示，女性吸煙者確實比男性吸煙者有較高罹患肺癌之危險 (女性：odds ratio = 27.9 , 95% CI : 14.9 ~ 52.0 ; 男性：odds ratio = 9.60 , 95% CI : 5.64 ~ 16.3)。Ryberg 等人 (1994) 曾比較男女性肺癌患者的吸煙量和所形成之 DNA 鍵結物含量時發現，女性患者在相同吸煙量下，所形成之 DNA 鍵結物含量較男性高，他們認為女性對香煙中基因毒物的易感性可能較男性為高，因此才會造成吸煙女性之 DNA 鍵結物比男性高。在台灣地區，男性吸煙人口有 54.75%，而女性肺癌患者絕大多數都沒有吸煙 (僅 3.27% 吸煙)，可是男性肺癌死亡率僅較女性高一倍多 (Department of Health , R.O.C., 1996)。最近本研究室發現台灣肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物的含量與吸煙數量無相關性 (Cheng *et al* , 2000)。在不吸煙的肺癌病患中，女性 DNA 鍵結物的含量比男性高出許多 (Cheng *et al* , 2000)。這些研究結果顯示吸煙無法解釋女性肺癌患者肺

組織中 DNA 鍵結物之含量為何較高，這可能和其它特殊環境因子，例如：煎魚油煙(Yang Master Thesis, 1997)或女性個體本身對毒物的敏感性較高有關。

三、細胞色素 P450 1A1(CYP 1A1)

由前述可知細胞色素 P450 1A1 (CYP1A1)參與 PAHs 化合物之代謝，而在體內形成 DNA 鍵結物。其 CYP1A1 基因活化的模式請參閱 Fig. 2。已知 CYP1A1 基因轉錄是透過 AhR 路徑所調控。細胞質中的 AhR 原本與熱休克蛋白 90 (heat shock protein 90, hsp90)結合，當配位體 (ligand) 如：TCDD 或 B[a]P 進入細胞內與 AhR 結合，則會造成 AhR 與 hsp90 分開，此時配位體-AhR 複合物會轉位至細胞核內，並與核內蛋白 Arnt 結合，此複合體會與 XRE DNA 序列結合，進而誘發 CYP1A1 基因的表現。有報告指出 AHH 的活性(Alexandrov *et al*, 1992)和 CYP1A1 基因的表現可能參與由煙草所誘發肺癌的形成的機轉 (Kouri *et al*, 1982; McLemore *et al*, 1990)。許多研究指出 CYP1A1 基因多型性，似乎可以解釋肺癌病患個體間的感受性 (Houlston *et al*, 2000)。過去本實驗室分析台灣地區不吸煙肺癌病患 DNA 鍵結物的含量，結果發現女性肺癌病患肺組織中，DNA 鍵結物含量較男性為高。本實驗室亦分析 CYP 1A1 基因多型性，但結果發現CYP 1A1 基因多型性與DNA 鍵結物含量無關 (Cheng *et al*, 2000)。因此 CYP 1A1 基因多型性並無法解釋台灣地區不吸煙男、女性肺癌病患間，對污染物暴露為何有不同的感受性。

四、Estrogen receptor (ER)的結構及活化

人類的雌性素受體(estrogen receptor, ER)基因位於染色體 6p25.1 上，全長大於 140kb，含有 8 個 exons 及 8 個 introns (Gosden *et al*, 1986; Menasce *et al*, 1993)，雌性素受體由 595 個胺基酸所組成，蛋白大小約為 66 KD (Green *et al*, 1986; Greene *et al*, 1986)，擁有 6 個 A-F 區域 (A-F domains) (Evans, 1988; Tsai *et al*, 1994)。N 端 A/B 結合位含有 transactivation function (AF-1)，C 結合區域即是與 DNA 結合的位置 (DNA binding domain)，C 端的 E 結合區域是配位體 (ligands)與受體結合之位置 (ligand binding domain)，且含有第二個轉錄活化區域 (AF-2)。有研究指出 AF-1 與 AF-2 彼此有協同作用，雌性素才能透過雌性素受體誘導轉錄活化作用 (Tora *et al*,

1989 ; Kraus *et al* , 1995) 。

雌性素會透過雌性素受體影響男、女性生殖器官，例如：乳腺、子宮、卵巢、睪丸及攝護腺的生長、分化及正常功能。雌性素主要是由卵巢及睪丸所產生，它們可以自由進出細胞膜，雌性素則藉由與細胞內不活化型的雌性素受體結合而被保留在細胞內。雌性素受體一旦與雌性素結合後，其蛋白的結構會發生改變，進而發生 homodimerization 及磷酸化，整個活化型的雌性素-雌性素受體複合物，會由細胞質中進入細胞核內 (Fig. 4) (Tsai *et al* , 1994)，結合至一段具有 13 鹼基對的 palindromic sequence : GGTCANNNTGACC - estrogen response element (ERE) (Klein-Hitpass *et al* , 1986 ; Kumar *et al* , 1987 ; Evans , 1988)，進而調控下游基因如：c-jun (Salmi *et al* , 1996)、c-fos (Hyder *et al* , 1994 ; Salmi *et al* , 1996)、bcl-2 (Bhargava *et al* , 1995)及 pS2 (Rajah *et al* , 1996)等基因的轉錄。

已知 TCDD 是典型的 PAHs 類化合物，在一些慢性毒性實驗發現，TCDD 可能會引起肝癌或鱗狀上皮細胞癌的形成，然而有些研究指出 TCDD 在某些組織中可能扮演不同角色。Vessey (1983)研究顯示，給與雌性老鼠長期服用 TCDD 會降低自發性乳房、子宮、腎上腺及腦下垂體腫瘤的罹患率。這是由於 TCDD 會透過 AhR 而抑制由雌性素所誘發之下游基因：c-fos protooncogene mRNA 的表現 (Duan *et al* , 1999)。Kharat 等人指出 TCDD 具有 anti-estrogenic 的效應，它會經由 AhR 來抑制雌性素所誘導的轉錄活化作用。這些結果均顯示，AhR 與雌性素受體間有交互作用 (crosstalk)。Caruso(1999)等人研究指出，Hsp90 蛋白會參與 AhR 與雌性素受體間的交互作用。Kling et al. (2000)研究亦顯示，某些 orphan receptor 及一些 coactivators、corepressors 會調控雌性素受體及 AhR 間的交互作用。

五、雌性素受體與肺癌

荷爾蒙受體在許多人類癌症組織中被發現，例如：雄性素受體 (androgen receptor) 存在於多數攝護腺癌中 (Jonsson , 1971)，而罹患攝護腺癌 (prostatic cancer)的病患，若有雄性素受體存在，就可以雌性素、黃體素(progesterin)或抗雄性素來治癒 (Stedman *et al* , 1980)。另外，罹患白血病的病人，若能偵測到皮質脂酮受體 (corticosteroids receptor)的存在，以類皮質糖治療這類病患，具有很好之療效 (Lippman *et al* , 1978)。

雌性素及雌性素受體與荷爾蒙依賴型的乳癌的發生及治療有很重要的關聯性。Hawkins 等人(1985)的報告指出雌性素受體在乳癌患者中的表現率約為 60% ~ 80%，而大多數的研究顯示雌性素受體有表現的乳癌病患比沒有表現的乳癌病患較好的治癒率和存活率以及較低之復發率 (Wittliff et al., 1984; Alexieva-Figush et al., 1988; Allred et al., 1990; Nagai et al., 1994)。雌性素受體亦存在於各種人類癌症中，似乎也會影響非荷爾蒙依賴型癌症的發展，如：胰臟癌 (Stedman et al., 1986)、肝癌 (Friedman et al., 1982)、胃癌 (Harrison et al., 1989)、大腸癌 (Harrison et al., 1989)以及肺癌 (Chaudhuri et al., 1982; Cagle et al., 1990)。雌性素可調控兔子胚胎和哺乳類肺細胞的分化與生長 (Sarda et al., 1980; Khosla et al., 1983)。過去許多研究顯示，性荷爾蒙會影響實驗動物肺腫瘤的發生 (Noronha RF and Goodall CM, 1984)。同時亦指出雌性素受體存在於肺鱗狀癌細胞及肺腺癌細胞 (Beattie et al., 1985)。由此可知，雌性素、雌性素受體在肺癌發展的過程中似乎扮演一部分的重要角色。

本計劃初步結果已顯示女性肺癌患者之肺組織具有較高之代謝活化多環芳香烴 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)之細胞色素 p450 1A1 (Cytochrome P450 1A1; CYP1A1) mRNA 的表現頻率且 DNA adduct levels 和 CYP1A1 蛋白表現量呈正相關 (Cheng et al., 2000)。因此推測低環境暴露之不抽菸，又具有低濃度 E2 之婦女肺組織中之芳香烴受體(Aryl hydrocarbon receptor; AhR)和雌性素受體 (Estrogen receptor; ER) 兩條訊號路徑可能有交互作用(cross talk)，而促進 CYP1A1 基因表現。本計劃第一年將以 RT-PCR 方法分析肺癌患者之肺組織中，ER 表現與否和 CYP1A1 mRNA 表現以及 DNA adduct levels 是否相關？比較不抽菸之女性肺癌患者肺腫瘤組織中之 ER mRNA 的表現，是否確實有別於抽菸和不抽菸之男性肺癌患者？而對 CYP1A1 芳香烴-DNA adducts，進而了解女性肺癌患者 CYP1A1 mRNA 表現是否和 ER 表現有關？然後以基因轉殖方式建立 ER 大量表現之肺癌細胞株 A549-ER，了解是否 ER 確實會影響 BaP induced-CYP1A1 轉錄和 BaP-DNA adduct 的形成。本計畫第二年計畫對 ER 在肺腫瘤形成之角色做相關研究。過去文獻指出乳癌細胞株中 ER 過度甲基化，可能參與 ER 基因轉錄之去活化，因此本計畫共收集 123 位非小細胞肺癌患

者其中包含不抽菸女性 32 位、不抽菸男性 33 及抽菸男性 58 位患者，以 Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) 方式偵測 ER 基因上分別位於 147、219、228 與 240 等 4 個 CpG island 位置，進一步探討 ER 基因甲基化發生頻率與肺癌形成之相關性。延續先前實驗結果本計畫第三年將由分子層次探討 ER 基因的表現參與這兩條訊號路徑之交互作用如何影響 CYP1A1 induction，進而提出有力之 AhR 和 ER 訊號路徑交互作用，調控 CYP1A1 轉錄之分子層次證據，以獲知不抽菸之台灣婦女為何對環境致癌物有易感性，進而引起肺癌的重要分子機轉。

四、研究方法

一、肺癌組織之來源與收集

本次研究所選取的非小細胞肺癌之腫瘤，皆由台中榮民總醫院胸腔外科在 1993 年至 2002 年間進行手術取得，立即急速冷凍於-80°C 冰箱中，本實驗採用的腫瘤分期，是依據 TNM：即腫瘤大小 (tumor size)、是否有淋巴結轉移 (node transference)、以及是否有遠端轉移 (metastasis)來決定其腫瘤分期。

二、肺組織之 DNA 萃取

將 50-100 mg 的非腫瘤組織加入少量液態氮並加以研磨後，加入 500 μ l 的 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1M NaCl, 25mM EDTA 及 0.5% SDS) 將組織完全水解，再加入 5 μ l proteinase K (10mg/ml)於 56°C 作用 12-18 小時，之後以傳統的 phenol/chloroform 法除去蛋白質。首先加入 500 μ l 的 phenol/ chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1)充分混合使蛋白變性，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液再加入 500 μ l chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 洗去殘餘之 phenol，充分混合後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液再加入 50 μ l 3M NaOAc (PH 5.2)及 1 ml 的 100%冰酒精於-20°C 冰箱作用 30 分鐘，藉以將 DNA 沉澱出。以 12,000 rpm 離心 20 分鐘後倒掉上清液，並加入 500 μ l 70% alcohol 洗去殘留之鹽類，12,000 rpm 離心 20 分鐘後倒掉上清液，並以真空抽乾殘餘的水分，所得之白色沉澱物即為 DNA。將沉澱出來之 DNA 以無菌水溶解並以紫外線光譜儀測定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A_{260}/A_{280} 比值應在 1.6 到 1.8 之間。若比值小於 1.6 則表示蛋白含量過高，應再以 proteinase K 處理後重複上述萃取步驟；若比值大於 1.8 則表示 RNA 含量過高，則應再以 RNase 處理後重複上述萃取步驟。DNA 的濃度以下列的公式計算： $DNA (\mu g/ml) = A_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數}$ 。DNA 萃取完成後，溶成濃度為 1 $\mu g/\mu l$ 置於-80°C 冰箱保存，以用於 DNA 鍵結物及基因多形性之分析用。

三、Promoter Hypermethylation 的分析

本研究利用 Methylation-Specific PCR (MSP) 的方法來檢測 ER 基因其促進子甲基化的情形。MSP 的實驗原理是運用 Sodium bisulfite 化學修飾(chemical modification) 的能力，將 DNA 上的 cytosine 轉變成 uracil。假如 cytosine 原本即具有甲基化 (5-methylcytosine) 的狀態時，Sodium bisulfite 則無法將其轉變成 uracil 而依然保持 cytosine 的型式，之後再使用 primer 將甲基化的 DNA 序列擴大(amplification)，進一步確認其為甲基化(methylated) DNA。此外並設計另一組 primer，針對原本即無甲基化而由 cytosine 轉變成 uracil 的 DNA，進行 DNA 序列擴大，而得知其為未甲基化(unmethylated)的 DNA。兩組 primer 序列如下：

ER-M： Sense- 5-GTGTATTTGGATAGTAGTAAGTTCGTC-3'

Antisense- 5'CGTAAAAAAAAACCGATCTAACCG-3'

ER-U： Sense- 5'GGTGTATTTGGATAGTAGTAAGTTTGT-3'

Antisense- 5'CCATAAAAAAAAAACCAATCTAACCA-3'

Bisulfite modification: 取 3 μg (濃度 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) tumor DNA 加入 10 μg calf thymus DNA (當作 carrier)，補二次水至 25 μl 及再加入 25 μl 0.4N NaOH (最終濃度 0.2 N) 混和均勻後，置於熱循環機反應 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘。取出加入 30 μl 10mM Hydroquinone 與 520 μl 3M pH 5.0 的 sodium bisulfite 混和均勻，置於乾浴加熱器(dry bath) 50 $^{\circ}\text{C}$ 16 個小時。接著用 Wizard DNA Clean-Up System 純化 DNA，其過程如說明書所示，稀釋成 50 μl 的 DNA 水溶液。最後加入 50 μl 0.6 N NaOH (最終濃度 0.3 N) 靜置室溫 5-10 分鐘，以終止 modification 的作用。並以酒精沉澱法將 DNA 萃取出來，溶於 10-15 μl 二次水中，存放於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中以供日後 PCR 反應之用。

PCR 反應如下：DNA 1 μl 、10 mM dNTP 1 μl 、10 \times PCR reaction buffer 5 μl 、2U / μl DyNAzymeTM II DNA polymerase 0.5 μl 及 10 mM primer 各 1 μl ，最後以滅菌水將體積補到 50 μl 。條件如下：94 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘後，94 $^{\circ}\text{C}$ 40 秒、Tm 55 $^{\circ}\text{C}$ 50 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 50 秒，以熱循環機重複 35 次，最後以 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘，降到 4 $^{\circ}\text{C}$ 時終止反應。PCR 產物經 2% agarose gel 電泳後，再以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘，再用紫外光

數位顯像儀拍照電泳的結果。

四、肺組織 RNA 萃取

取適當大小之組織，以液態氮研磨後加入 TRIzol 1 ml 水解組織，於室溫反應 10 分鐘，加入 200 μ l chloroform 混合均勻離心後取上清液，加入 500 μ l isopropanol 室溫反應 15 分鐘沈澱 RNA，12,000 rpm 離心 15 分鐘倒掉上清液，以 75% 酒精洗去殘留的鹽類，離心留下 RNA 沈澱物溶於 DEPC H₂O，以紫外線光譜儀測定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值應在 1.7 到 1.9 之間。RNA 的濃度以下列的公式計算：RNA (μ g/ml)=A₂₆₀×40×稀釋倍數。淋巴球則直接加入 TRIzol 500 μ l 水解細胞，其餘步驟如肺組織 RNA 之萃取相同。上述方法是依 TRIzol reagent (GIBCO, BRL, USA) 所附的說明書所述之步驟進行。

五、Estrogen receptor 及 CYP1A1 之 RT-PCR 分析

取 5 μ g total RNA 以 5 pmole/ μ l oligo dT 為 primer，於 72°C 反應 10 分鐘，使 oligo dT 接合到 RNA 模板上，再加 5 μ l 反轉錄酵素反應 buffer 及 2 μ l 0.1M DTT, 1 μ l 10 mM dNTP mix 在 42°C 下作用 2 分鐘後，再加入 1 μ l 反轉錄酵素 (reverse transcriptase)，在 42°C 下作用 50 分鐘合成 cDNA 用做 PCR 分析用。PCR 反應條件如下：1 μ l cDNA, 0.5 mM dNTP, 5 μ l PCR reaction buffer, 2.5U Taq polymerase, 0.5mM primer*, 其總反應體積為 50 μ l，置入 PCR 中以 94°C 1 分鐘, 58°C 1 分鐘, 72°C 1 分 15 秒反應條件重複 35 cycles，最後以 72°C 反應 10 分鐘。反應所得之 PCR 產物以 2% agarose gel 進行電泳分析，並以 ethidium bromide 染色。CYP1A1 mRNA 則以 Densitometer 定量。

*Oligo primer 列舉如下：

Oligo primer	Sequence	Tm ()
ER sense	5'-GCAATGACTATGCTTCAGGCTACC-3'	58
ER antisense	ACACAAACTCCTCTCCC-3'	
CYP1A1 sense	5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3'	60(C
CYP1A1 antisense	5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3'	
β -actin sense	5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'	54(C
β -actin antisense	5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'	
ER full-length sense	5'-ATGACCATGACCCTCCACACC-3'	58
ER full-length antisense	5'-AS:TCAGACTGTGGCAGGGAAACC-3'	

六、Estrogen receptor 轉植實驗

抽 MCF-7 乳癌細胞株之 RNA，將其反轉錄成 cDNA，以此 cDNA 為模板以 PCR 方式 amplify full length ER，primer 序列如上。跑 1% agarose gel 確定 PCR 產物，之後以 GENECLEAN III Kit (BIO 101) 純化此 PCR 產物。取純化後的產物 7 μ l、加 1 μ l T4 DNA ligase buffer(10X)、1 μ l T4 DNA ligase (3 Wesis unit/(l)及 1 μ l pTARGETTM vector，於 4 $^{\circ}$ C 進行 ligation。將 ligation 完後的產物取 2 μ l，加 50 μ l competent cells，輕輕的攪拌均勻，置於冰上反應 20 分鐘，之後於 42 $^{\circ}$ C 反應 45~50 秒，迅速放在冰上 2 分鐘，在加入 450 μ l SOC medium，置於 37 $^{\circ}$ C，shaking (150rpm)90 分鐘。之後離心 1000rpm，10 分鐘，去上清液，加 100 μ l SOC medium、100(l IPTG (236mg/10ml) 及 10(l 10%(-Gal，混合均勻後塗在 LB plate 上，於 37 $^{\circ}$ C 培養 12-16 小時。待長出白色 colony 用挑菌棒挑出此 colony 養在 5ml LB broth，之後取 1.5ml 菌液，以 PlasPrep 抽 plasmid DNA。取 7(l plasmid DNA 加 1(l EcoR I、1(l BamH I 及 1(l EcoR I buffer，於 37 $^{\circ}$ C 反應 1-2 小時，跑 1% agarose gel 確定是否有將 ER 接進此 plasmid 內。將 A549 細胞以 1 x 10⁵ / well 種在 6 well plate 中。先取 500(l 2X HBS / well 加入另一新的 6 well plate，使其分佈均勻。取 20 (g plasmid DNA 加 417.5(l 的水混合均勻，再加入 62.5(l 2M CaCl₂，充分混合後，慢慢滴入剛剛所準備好的 HBS 內，混合後，靜置於室溫，反應 15-30 分鐘，之後再將這混合液，慢慢滴入細胞中。最後以 G-418

作篩選。

七、BPDE-DNA 鍵結物含量之分析 32P-postlabelling 分析(Gupta , 1985; Gupta and Earley, 1988)

將上述萃取、純化出來的 DNA 利用 32p-postlabelling 方法分析 PAH-DNA 鍵結物。首先取 2µg DNA 加入含有 0.75 unit micrococcal endonuclease (MN) 和 7.75 µl spleen phosphodiesterase (SPD) 之 succinate buffer (10 mM sodium succinate, pH 6.0)中，經 37°C 水浴反應 4 小時後，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3'-monophosphate。再加入 6 mg Nuclease P1 (NP1)，sodium acetate 以及 ZnSO₄ 於 37°C 反應 1 小時。然後加入含有 5 units 之 T4 polynucleotide kinase 和 1 ml 10 mCi [(-32P)-ATP 的混合液，於 37°C 作用小時以進行 32p-postlabelling 反應，最後將此放射性標記過的 DNA 鍵結物反應液點在 PEI-cellulose TLC plate 上，利用三種移動相、三個方向展開，每次展開後都要經過剪除濾紙、洗片和晾乾的步驟。三種移動相分別為 D1- 0.65 M sodium phosphate (pH 6.0)； D3- 3.6 M lithium formate, 8.5 M urea (pH 3.5)； D4- 0.8M lithium chloride, 0.5 M Tris base, 8.0 M urea (pH 8.0)。展開後的 TLC 片先以 counter 測定其放射性強度後放入 X 光片夾中，以 TLC 片子上的放射性強度決定置於 -80°C 冰櫃中穩定顯影的時間(強度為 1K cpm 則壓片約 24 小時)。曝光後，X 光片上會顯出 DNA 鍵結物之位置。另外，稀釋 DNA 水解溶液並以[(-32P)-ATP 標記所有核苷酸(nucleotides)，將此放射性標記過的反應液點在 PEI-cellulose TLC plate 上，然後利用 40 mM ammonium sulfate (pH 5.27)溶液展開，確定所有核苷酸之總量。定量時依照 X 光底片上的相對位置，將 PEI plate 上的 DNA 鍵結物與所有核苷酸剪下，置於 Mini poly-Q vial 內，再加入 3 ml 閃爍計數液，以 Beckman L-6500 Scintillation Counter 測定其放射性強度。以下列公式計算 DNA 鍵結物之相對含量:

$$\text{Relative adduct labeling (RAL)} = \text{cpm in adducts} / \text{cpm in total nucleotides} / \text{dilution factor}$$

八、Estrogen receptor siRNA 轉植實驗

根據 ER α mRNA 之序列設計 21 base 長度之 oligonucleotide (如下)，將上下兩股 siRNA 溶於 anealing buffer 中，在 37°C 的條件下進行。當此兩股 anealing 後，於 5'-端與 3'-端分別會有 BamH I 及 HindIII 的接位。取 anealing 反應後的產物 7(μ l) + 1(μ l) T4 DNA ligase buffer(10X)、1(μ l) T4 DNA ligase (3 Wesis unit/ μ l) 及 1(μ l) pSilencer 3.0-H1 vector，於 16°C 中進行 ligation。將 ligation 完後的產物取 2(μ l) + 50(μ l) competent cells，輕輕的攪拌均勻，而後於 42°C 反應 45~50 秒，迅速放在冰上 2 分鐘，加入 500 μ l 未加抗生素之 LB broth 中，在 37°C 以 200 rpm 的速度搖晃一小時，而後塗抹於 LB plate 上，於 37°C 培養 12-16 小時。長出白色 colony 以挑菌棒挑出此 colony 培養於 5ml LB broth，之後取 1.5ml 菌液，以 PlasPrep 抽 plasmid DNA。取 1 μ l plasmid DNA 以 M13 primer 進行 PCR，並進行此 PCR 產物的序列分析，已確定 insert 的序列。將 CL5 細胞以 1×10^5 / well 種在 6 well plate 中。先取 500 μ l 2X HBS / well 加入另一新的 6 well plate，使其分佈均勻。取 20 μ g plasmid DNA 加 417.5 μ l 的水混合均勻，再加入 62.5 μ l 2M CaCl₂，充分混合後，慢慢滴入剛剛所準備好的 HBS 內，混合後，靜置於室溫，反應 15-30 分鐘，之後再將這混合液，慢慢滴入細胞中，培養約八小時後，以 G-418 進行篩選。

The insert of estrogenreceptor siRNA :

Top strand oligonucleotide template:

5'-gatccagattggccagtaccaatgttcaagagacattggtactggccaatcttttttgaaa-3'

Bottom strand oligonucleotide template:

5'-agctttccaaaaaagatggccagtaccaatgtctcttgaacattggtactggccaatctg-3'

九、西方點墨法 (Western blot) :

於適當培養皿中植入適當之細胞數 (1×10^6 / 60 mm dish)，經 overnight 且係包著床後，投予不同藥物處理，於適當時間後以 1x PBS 清洗，加入適當 protein lysis buffer (Tris 100mM, pH=8.0、SDS 1%)，以 policeman 將細胞刮下置於 1.5 ml 的離心管中，

放置於冰上 20 分鐘後，以 14500 rpm、30 分鐘、4 分鐘離心，取上清液，以 Bio-rad protein assay 試劑 (Bio-rad Co.) 測定蛋白濃度，將蛋白質萃取液保存於-80°C 備用，取 30 µg 蛋白加入 5µl protein loading buffer 中，於 100 °C 中反應五分鐘，將此蛋白萃取液加入 7.5% SDS-PAGE 電泳膠片的 well 中，填注 1x SDS Running buffer，以 60V、85V 進行電泳，於一定位置後取下膠片進行轉印。

將轉印後的 PVDF 轉印膜以 blocking buffer 於室溫中反應一小時，而後以一級抗體 (primary antibody) 在 1:1000 的比例下置於室溫中反應 overnight，再以 PBST (0.1% Tween20 溶於 PBS 中) 清洗三次，每次五分鐘，然後加入相對應之二級抗體 (secondary antibody) 以 1:5000 的稀釋比例於室溫中反應一小時，再以 PBST buffer 清洗數次，接著以 ECL 試劑反應一分鐘，將其產生之冷光以 Kodac-Omat film 顯影。

十、Gel Retardation assay: electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

(一)、DRE Probe 5'-end labeling

將兩股 single strand DRE 或 AHR oligonucleotides (positive / negative,) 鍵結成 double strand，經 65 °C denature 10 分鐘，於室溫下靜置冷卻。取上述製備好之 DRE 或 AHR (100 ng) 加入含有 T4 kinase 及 $[\gamma\text{-}^{32}\text{p}]\text{-dATP}$ 之混合液中於 37 °C 水浴反應 30 分鐘，接著加入 100µl 2.5M ammonium acetate，於 70 °C 反應 15 分鐘後冷卻至室溫，加入 1µl tRNA(6.0 mg/ml)及預冷之酒精，混勻後於 12,000 rpm 離心 20 分鐘。將上清液去除並於室溫下將殘留之酒精風乾，接著加入 200 µl TE buffer 及 200 µl phenol/chloroform (1:1) 混勻後於 12,000 rpm 離心 20 分鐘。將上清液移至另一新的 eppendorf，加入適量體積之 3M sodium acetate 及預冷之酒精，經 12,000 rpm 離心 20 分鐘後，將上清液去除並於室溫下將殘留之酒精風乾，最後溶於適量體積之 TE buffer，並取 1 µl 置於 Mini poly-Q vial 內，再加入閃爍計數液以 Beckman L-6500 Scintillation Counter 測定其放射性強度。

(二)、細胞核蛋白之製備(Qu *et al.*, 1995)

將轉染後之細胞加入 0.9 ml HEGD buffer (25 mM HEPES, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % glycerol, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, pH7.6) 以 rubber policeman 刮下細胞，經 4°C 1,000 xg 離心 5 分鐘，去除上清液並

加入 0.5 ml HEG (HEGD without glycerol) 混合均勻後，以研磨器(Dounce cell homogenizer) 研磨細胞約 20 下，經 4°C 1,000 xg 離心 10 分鐘後去除上清液，於細胞沉澱物中加入 100 μ l HEGD-KCl (HEGD buffer and 0.5 M KCl) 混合均勻後置於冰浴中緩慢搖動 1 小時，經 4°C 10,000 xg 離心 30 分鐘後收集上清液，並以 Bio-Rad protein assay 定量細胞核蛋白質含量。

(三)、Gel retardation 分析(Merchant *et al.*, 1993)

本實驗是在測定蛋白質受體 (protein receptor) 與 32 P 標定的 DNA oligonucleotides 鍵結的能力。取 15 μ g 核蛋白加入 15 μ l HEGD buffer 及 2 μ l 1 μ g/ μ l poly d[I-C] 於室溫下反應 15 分鐘後，再加入 2.5 μ l (20 pg/ μ l) 32 P 標定的 DRE 片段混合後，於室溫下反應 15 分鐘，最後加入 5 μ l loading dye 混合均勻後於 5 % acrylamide gel (29 ml ddH₂O, 5 ml 40 % acrylamide, 4 ml 10 x Tris-Glycine, 2 ml 100 % glycerol, 100 μ l APS, 50 μ l TEMED) ，以 120V 電泳 2.5 小時後，將膠片烘乾並置於 X 光片上曝光，最後以數位化影像處理系統(Densitometer, Alpha Imager 2000) 比較其相對亮度(integrity density value, IDV) 。

五、結果

本計畫擬針對 ER 在肺腫瘤形成之角色做相關研究。首先針對 45 位不抽菸女性肺癌患者，49 位不抽菸男性肺癌患者，以及 52 位抽菸男性肺癌患者之腫瘤和周邊非腫瘤肺組織進行之 DNA 和 RNA 進行 DNA adduct 和 CYP1A1 mRNA 的分析。結果發現不抽菸女性肺癌患者有 34 個檢體有 CYP1A1 mRNA 的表現 (34 of 45, 76%)，其表現率顯著高於不抽菸男性患者 (26 of 49, 53%, Table 1)，而抽菸男性肺癌患者亦有較高之 CYP1A1 mRNA 的表現率 (44 of 52, 85%, Table 1)，其表現率顯著高於不抽菸男性患者，但卻與不抽菸女性肺癌患者沒有統計上的差異。當 CYP1A1 mRNA 的表現量，以控制基因 β -actin 比較做半定量分析之結果，進一步與已完成 55 個不抽菸之男、女性肺癌患者 DNA adduct 含量分析的樣本做相關性分析，結果發現肺癌患者之 DNA adduct 含量與 CYP1A1 mRNA 的表現量呈正相關性 ($r = 0.375$, $P = 0.005$, Fig. 1A)。這結果似乎和本研究室過去之發現，不抽菸之女性肺癌患者之 DNA adduct 含量較不抽菸男性患者高相似，且抽菸與否，與肺癌患者之肺組織中 DNA adduct 的含量沒有影響 (Cheng et al., 2000)。因此證實肺癌患者週邊正常肺組織中 CYP1A1 mRNA 的表現，確實對肺組織 DNA adduct 之形成有重大之影響。

而在 ER mRNA 的分析 55 位不抽菸之男、女性肺癌患者，結果顯示有 ER mRNA 表現之肺癌患的 DNA adduct 含量 (50.73 ± 31.89 adducts/ 10^8 nucleotides) 較沒有 ER mRNA 表現的 DNA adduct 含量 (35.07 ± 26.67 adducts/ 10^8 nucleotides) 高，但未達統計上的顯著差異 ($P = 0.061$)。進一步分析 CYP1A1 mRNA 和 ER mRNA 表現是否有關？結果發現 CYP1A1 mRNA 與 ER mRNA 表現量，雖未達統計上之相關性，但其間有正之相關性之趨勢 ($r = 0.235$, $P = 0.087$, Fig. 1B)。因此不抽菸女性肺癌有較高之 DNA adduct 含量，可能是 ER 調控路徑和調控 CYP1A1 基因轉錄主要之路徑—AhR 之間可能有交互作用所致。過去文獻指出乳癌細胞株中 ER 過度甲基化，參與 ER 基因轉錄之去活化，而與乳癌腫瘤化有關，因此可由 ER 之甲基化是否參與女性肺癌之形成，或許更能找到 ER 在肺癌形成之相關性。因此第二年進行 ER

之甲基化與 ER 基因之轉錄去活化之相關性研究。本研究收集 123 位非小細胞肺癌患者其中包含不抽菸女性 32 位、不抽菸男性 33 及抽菸男性 58 位患者 (Table 2)，以 Methylation specific polymerase chain reaction (MS PCR) (Fig. 2B) 方式偵測 ER 基因上位於 147、219、228 與 240 等 4 個 CpG island 位置，探討 ER 基因甲基化發生頻率與肺癌形成之相關性，並進一步以自動 DNA 直接定序法 (Fig. 2C) 確定其甲基化位置與 MS-PCR 結果之一致性。以 SPSS 軟體統計分析，發現肺腫瘤組織中 ER 甲基化發生頻率為 54%，且女性發生頻率遠低於男性患者 ($p = 0.01$, Table 2)，且抽菸男性患者 ER 甲基化頻率顯著高於不抽菸男、女性患者 ($P = 0.039$)，而與其他臨床因子包括年齡、腫瘤型態、腫瘤分期與抽菸習慣皆無相關性。以單變項 Kaplan-Meier 統計分析 ER 甲基化表現與臨床預後之相關性，結果發現 ER 甲基化表現之肺癌患者其存活率顯著低於表現之患者 ($P = 0.0058$)。進一步以多變項迴歸統計 (Cox-regression) 分析 ER 是否可做為肺癌之臨床預後指標，結果發現 ER 甲基化、性別、腫瘤形態與腫瘤分期等皆與肺癌患者之存活有關。由此初步結果顯示 ER 甲基化可做為獨立顯著的肺癌之預後生物指標。為了解 ER 甲基化是否會影響 ER mRNA 的表現？本計劃進一步以 RT-PCR 方法分析 123 非小細胞肺癌患者之腫瘤組織中 ER mRNA 表現與 ER 甲基化之相關性 (Fig. 2A)，結果發現 ER 促動子發生甲基化時，有 71% ER 基因 mRNA 不表現 ($P = 0.007$, Table 2)。因此肺腫瘤組織中 ER 促動子過度甲基化，可能參與 ER 基因轉錄之去活化。過去文獻指出在乳癌組織與細胞株研究發現，ER 基因促動子之過度甲基化參與 ER 基因之轉錄抑制，而本研究也偵測到 ER 基因之不表現與甲基化有關。Stabile LP et al., (2002) 指出以雌性素類似物 ICI 182,780 處理肺癌細胞株 H23 可以有效抑制老鼠肺腫瘤形成，推測 ER 可能也參與肺腫瘤的形成，本計畫進一步以 A549 肺癌細胞進行 ER cDNA 轉染實驗，使 A549 細胞大量表現 ER (Fig. 3A)。當比較 ER 轉染的前後之細胞中 CYP1A1 的表現是否不同？結果發現具有 ER 表現之細胞的 CYP1A1 轉錄活性，顯著高於沒有轉染 ER 的 A549 細胞 (Fig. 3B)。進一步以 Gel retardation assay 分析得知轉染 ER 表現會促使 AhR/Arnt 結合於 DRE 的能力增高 (Fig. 4)。由以上之細胞實驗證實 AhR 和

ER 路徑之間有交互作用，而造成 AhR 活化促使 CYP1A1 mRNA 的轉錄活化。

根據上述研究結果本研究第三年針對表現不同程度 ER 之肺癌細胞株，進一步深入探討 ER 在肺腫瘤形成所扮演之角色，並佐以細胞轉染實驗儘速在肺癌細胞找到調控 AhR 和 ER 兩個路徑交互作用的蛋白質，將持續在組織與分子層次尋找不抽菸之台灣婦女為何對環境致癌物有易感性證據，進而引起肺癌的重要分子機轉。

第三年研究工作中，利用轉染 siRNA 片段進入細胞可對目標基因 mRNA 進行降解的機制，試圖培養出 ER α 低度表現之肺癌細胞。本年之研究，選取從台灣女性肺腺癌細胞所培養出之細胞 (CL5)，並將 ER α siRNA 片段轉染入 CL5 中，試圖阻止 ER α 蛋白表現。以西方點墨法分別偵測轉染與未轉染之 CL5 細胞中 ER α 蛋白表現，初步發現，已轉染 ER α -siRNA 之 CL5 細胞的 ER α 蛋白表現下降 (Fig. 5A)，確定 ER α -siRNA 具降解 ER α 蛋白之功能。後續以抗生素處理細胞，並篩選出 ER α -siRNA 穩定表現且造成 ER α 蛋白表現明顯降低之細胞株 (Fig. 5A)。根據前兩年之研究結果，女性對於環境污染物有較高的感受性，過去的研究亦顯示，ER α 蛋白與 AhR 蛋白之間具有交互作用，可活化 ER α 轉錄活性 (Ohtake et al., 2003)。因此推測 ER α 蛋白與 AhR 蛋白之間的交互作用可能參與 AhR 轉錄途徑，促進 AhR 之轉錄活性。為了了解 ER α 於 AhR 轉錄途徑中所扮演的角色，本計劃針對 CYP1A1 蛋白於 CL5-ER α^- 與 CL5-ER α^+ 細胞株中之差異進行分析，結果發現，在不同條件處理下 CL5-ER α^+ 之 CYP1A1 蛋白表現明顯高於 CL5-ER α^- (Fig. 5B)，此結果暗示 CYP1A1 蛋白表現可能會受到 ER α 蛋白的影響，因此當細胞中 ER α 蛋白表現量降低時，CYP1A1 之表現亦即降低。於 AhR 轉錄過程中，AhR 與 Arnt 於核內形成 AhR/Arnt 複合體，結合於 DNA 之 DRE 的位置，並進行轉錄，表現下游基因，故利用 Gel retardation assay 偵測 AhR/Arnt 結合於 DRE 之能力，藉此探討 ER α 表現是否會影響 AhR 之轉錄活性。結果發現，ER α 蛋白低度表現之細胞其 AhR/Arnt 結合於 XRE 的能力亦有下降的趨勢 (Fig. 6)。在肺細胞中，AhR 蛋白與 ER α 蛋白間具有交互作用，且 ER 活化 AhR 的轉錄活性，促進 CYP1A1 蛋白之表現。且女性肺癌患者其 ER 啟動子甲基化頻率較低，女性有較高機會表現 ER 在肺癌組織中，再經由 ER 與 AhR

之交互作用，而活化主要參與代謝多環芳香烴之 CYP1A1 的轉錄，因此女性肺癌有較高之 DNA adduct levels。本計畫由肺腫瘤組織與細胞實驗的結果都能印證女性有較高之 DNA 傷害易感性是經由 ER 與 AhR 交互作用所致。

六、討論

本計畫主要在肺腫瘤組織發現不抽煙之女性肺癌之 CYP1A1 mRNA 的表現顯著較不抽煙之男性為高，且與 DNA adduct levels 有相關性。以上發現與過去在抽煙之男、女性肺癌有相似的結果。這顯示無論與不抽煙之肺癌患者對香菸與環境暴露中之污染物之感受性，都是女性高於男性。但是不同之流行病學報告卻有不同之結果。有的認為女性有較高之罹患肺癌之危險性，但是有的卻認為沒有。這些報告都是在探討男、女性對抽煙罹患之肺癌之危險性。均無討論不抽煙者男女性罹患肺癌之危險性是否不同？若以本計畫之研究結果可推測女性確實對環境污染物之感受性較高，因此即使不抽煙，台灣女性罹患肺癌之危險性與抽煙男性僅有一倍之差異。本研究主要結果是在比較經過 small interference 處理剔除 ER 基因表現之三株 ERsi 之細胞，較有 ER 表現之原來肺癌細胞之 CYP1A1 蛋白表現低的多。這顯示沒有 ER 時，AhR 進入核內與 Arnt 結合量減低。當然此實驗是在沒有或極低 E2，但有 BaP 處理之情形下才能發現。即 ER 是 unligand，而 AhR 是 ligand 情形下。因此發現肺癌細胞，unliganded ER 會與 liganded AhR 結合進入核內，然後再與 Arnt 結合，而結合到 XRE 啟動 CYP1A1 之轉錄活化。在乳癌細胞中，已發現沒有 ER 表現之細胞的 CYP1A1 不會被 TCDD 誘發表現。但在有 ER 之乳癌細胞則會誘發 (Brockdroff et al., 2000)。若在 E2 存在下，liganded ER 會抑制 AhR 活化 CYP1A1 之轉錄。最近在乳癌之細胞實驗發現 liganded AhR 會促進 unliganded ER 進入核內，再與 Arnt 結合成複合體，然後再結合到 ERE，啟動 ER 路徑調控之下游基因，例如 cathepsin D, pS2, c-fos 等 (Ohtake et al., 2003)。這與我們在肺癌細胞發現作用機轉非常類似，僅是標的之訊號路徑與基因不同。有研究指出以抑制 proteosomal degradation 之 inhibitor，例如 MG-132, geldanamycin 等處理後會在細胞質中推積 AhR，且會進入核內，但此 AhR 並非因有 ligand 結合而進入核內，因此無法活化 CYP1A 基因之轉錄 (Wormke et al., 2003)。由此可知 liganded AhR 才能活化轉錄 CYP1A1 之基因表現。

在轉錄活化 CYP1A1 必須有 Arnt 之結合，有趣的是 Arnt 之含量不會因有無 proteosomal degradation 之抑制劑之處理，都不會改變其蛋白表現量 (Song et al., 2002)。因此 CYP1A1 之調控主要決定於是否有 liganded AhR。

肺臟並非 E2 之主要標的器官，而肺組織中 E2 之含量原來就較低，若還有較高之 CYP1A1 基因表達，則使其易被代謝，而更減低 E2 之含量。通常女性肺患者大多為停經婦女，因此在肺組織中之 ER 可能大多在 unliganded 之狀態，故不易被分解，而相對於抽煙者，有較低環境污染物之女性肺組織可能有較多沒有被分解之 liganded AhR。由於有較高之污染物之暴露，如抽煙，則會促進 proteosomal degradation，而使得 AhR 與 ER 都會被分解 (Wormke et al., 2003)。由於以上在肺組織之可能性，因此我們在細胞實驗中模擬上述情況，即發現 unliganded ER 會與 liganded AhR 交互作用，而促進形成 AhR-ER 進入細胞核內，再與 Arnt 形成 AhR-Arnt-ER 之複合體與 XRE 結合，使 CYP1A1 轉錄活化。

總之，本計畫提出不抽煙女性肺癌組織有較多之 unliganded ER 與 liganded AhR 交互作用，而促使 AhR 被活化進入核內，轉錄活化 CYP1A1，而造成不抽煙女性肺癌有較高之 DNA adduct levels。當然本研究室亦有不抽煙女性有較低之 XPC DNA 修補基因之表現，也可能參與造成女性有較高之 DNA adduct levels。

七、參考文獻：

- Alexandrov K , Rojas M , Geneste O , Castegnaro M , Cams A M , Petruzzelli S , Giuntini C and Bartsch H (1992) An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo [a] pyrene diol–epoxide–DNA adducts in smokers' lung : coparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity . *Cancer Res .* , 52 , 6248-6253.
- Alexieva–Figusch J , van Putten WLJ , Blankenstein MA , Blonk – van der Wijst J and Klijn JGM . (1988) The prognostic value and relationship of patient characteristics , estrogen and progesterin receptors , and site of relapse in primary breast cancer . *Cancer* , 61 , 758 – 768.
- Allred DC , Bustamante MA , Daniel CO , Gaskill HV and Cruz AB (1990) Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas . *Arch. Surg.* , 125 , 107 – 113.
- Alvaro Puga, Ying Xia et al., (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chemico-Biology Interactions* 141: 117-130.
- Beattie CW , Hansen NW and Thomas PA (1985) Steroid receptors in human lung cancer . *Cancer Res.* , 45 , 4206 – 4214.
- Bettina L. Brockdorff, Jan skouv, Birgit E. Reiter and Anne E. Lykkesfeldt (2000) Increased expression of cytochrome P450 1A1 and 1B1 genes in anti-estrogen-resistant human breast cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, 88, 902-906.
- Bhargava V , Kell DL , van de Rijn M and Warnke RA (1995) Bcl–2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity . *Am. J Pathol.* , 145 , 535 – 540.
- Cagle PT , Mody DR and Schwartz M (1990) Estrogen and progesterone receptors in bronchogenic carcinoma . *Cancer Res.* , 50 , 6632 – 6635 . Bettina L. Brockdorff,

- Jan Skouv et al., (2000) Increased expression of cytochrome P450 1A1 and 1B1 genes in anti-estrogen-resistant human breast cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 88: 902-906.
- Cagle PT , Mody DR and Schwartz M (1990) Estrogen and progesterone receptors in bronchogenic carcinoma . *Cancer Res.* , 50 , 6632 – 6635.
- Carolyn M. Klinge, Jennifer L. Bowers et al., (1999) The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Molecular and Cellular Endocrinology* 157: 105-119.
- Chaudhuri, P. K., Thomas. P. A., Walker. M. J., et al. (1982) Steroid receptors in human lung cancer cytosols . *Cancer Lett.* , 16 , 327 – 332.
- David C.Spink, Barbara H.Katz et al., (2003) Estrogen regulate Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 24(12): 1941-1950.
- Duan R , Porter W , Samudio I , Vyhldal C , Kladde M and Safe S (1999) Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol : mechanism of aryl hydrocarbon receptor –mediated inhibition . *Mol. Endocrino.* , 13, 1511 – 1521.
- Ernster VL (1994) The epidemiology of lung cancer in women . *Annals of Epidemiology.* , 4102 – 4110.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* , 240 , 889-895.
- Friedman MA , DemanesDJ and Hoffman PG (1982) Hepatomas: hormone receptors and therapy. *Am. J. Med.* , 73 , 362 - 366.
- Fumiaki Otake, Ken-ichi Takeyama et al., (2003) Modulation of oestrogen receptor signaling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423: 545-550.
- Garner RC , Cazick J , Jenkins D , Phillips DH , Hewer A , King MM and Routledge MN (1990) Linear relationship between DNA adducts in human lung and cigarette

- smoking . IARC Sci . Publ . , 104 , 421 – 426.
- Gerde P , Medinsky MA and Bond JA (1991a) Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons-a reappraisal of their possible role in pulmonary carcinogenesis .
Toxicol. Appl. Pharmacol. , 108, 1 – 13.
- Gerde P , Cheng YS and Medinsky MA (1991b) In vivo deposition of ultrafine aerosols in the nasal airway of the rat . *Fundam. Appl. Toxicol.* , 16, 330 – 336.
- Gerde P , Medinsky MA and Bond JA (1991c) The retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bronchial airway and in the alveolar region-a theoretical comparison . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* , 107, 239 – 252.
- Gosden JR , Middleton PG and Rout D (1986) Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24–q27 by *in situ* hybridization . *Cytogenet. Cell Genet.* , 43, 218 – 220.
- Green S , Walter P , Kumar V , Krust A , Bornert J–M , Argos P and Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA sequence expression and homology to v-erb-A. *Nature* , 320, 134-139.
- Greene GL , Gilna P , Waterfield M , Baker A , Hort Y and Shine J (1986) *Science* , 231 , 1150-1154 .
- Harrison JD , Watson S and Morris DL (1989) The effect of sex hormones and tamoxifen on the growth of human gastric and colorectal cancer cell lines. *Cancer* (Philadelphia) , 63, 2148 – 2151.
- Hawkins RA (1985) Receptors in the management of breast cancer . *Br . J Hosp. Med.* , 34, 160 – 164.
- Hollie I. Swanson (2002) DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chemico-Biology Interactions* 141: 63-76.
- Houlaton RS (2000) CYP 1A1 polymorphisms and lung cancer risk : a meta – analysis .
Pharmacogenetics , 10, 105-114.
- IARC (1986) Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans ,

- Vol . 38 , Tobacco Smoking , International Agency for Research on Cancer , Lyon.
- James A.Mobley and Robert W.Brueggemeier (2004) Estrogen receptor – mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 25(1): 3-9.
- Jones NJ , McGregor AD and Waters R (1993) Detection of DNA adducts in human oral tissue : correlation of adduct levels with tobacco smoking and differential enhancement of adducts using the butanol extraction and nuclease P1 versions of ³²P–postlabelling . *Cancer Res.* , 53, 1522 – 1528.
- Jonsson G , Hogberg B (1971) Treatment of advanced prostatic carcinoma with Estracyt . *Scand. J Urol. Nephrol.* , 5, 103 – 108.
- Khosla SS , Brehier A , Eisenfeld AJ , Ingleson LD , Parks PA and Rooney SA (1983) Influence of sex hormones on lung maturation in the fetal rabbit . *Biochimica. Biophysica. Acta.* , 750, 112 – 126.
- Klein-Hitpass L , Schorpp M , Wagner U and Ryffel G U (1986) An estrogen - responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* , 46 , 1053-1061.
- Klinge CM , Kaur K and Swanson HI (2000) The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TF1 and ERR α 1 . *Arch. Biochem. Biophys.* , 373, 163 – 174.
- Kouri RE , McKinney CE , Slomiany DJ , Snodgrass DR , Wray NP , McLemore TL (1982) Positive correlation between acyl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analysed in cryopreserved lymphocytes . *Cancer Res.* , 42, 5030-5037.
- Kraus WL , Mcinerney EM and Katzenellenbogen BS (1995) Ligand – dependent , transcriptionally productive association of the amino– and carboxy- terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 92 ,

12314-12318.

Kumar V , Green S , Stack G , Berry M , Jin J–R and Chambon P (1987)

Functional domains of the human estrogen receptor . *Cell* , 51 , 941-951.

Hyder SM and Stancel GM (1994) *In vitro* interaction of uterine estrogen receptor with the estrogen response element present in the 3'–flanking region of the murine c–fos protooncogene . *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* , 48 , 69 – 79.

Lippman M , Yarbrow G and Leventhal B (1978) Clinical implication of glucocorticoid receptors in human leukemia . *Cancer Res.* , 38 , 4251 – 4256 .

Mark Wormke, Matthew Stoner et al., (2000) Crosstalk between estrogen α and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS* 478: 109-112.

Mark Wormke, Matthew Stoner et al., (2003) The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor α through activation of proteasomes. *Molecular and cellular biology* 23(6): 1843-1855.

McLemore TL , Adelberg S , Liu MC , McMahon NA , Yu SJ , Hubbard WC (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer : evidence for cigarette smoke – induced gene expression in normal lung tissue and for pulmonary carcinomas . *J Natl. Cancer Inst.* , 82 , 1333-1339

Menasce LP , White GRE , Harrison CJ and Boyle JM (1993) Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post – FISH banding technique . *Genomics* , 17 , 263 – 265.

Michael E. Burczynski, Trevor M. Penning (2000) Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-Quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer research* 60: 908-915.

Michael S. Denison, Alessandro Pandini et al., (2002) Ligand binding and activation of

- the Ah receptor. *Chemico-Biology Interactions* 141:3-24.
- Nagai MA , Margues LA , Yamamoto L , Fujiyama CT and Brentani MM (1994) Estrogen progesterone receptor mRNA levels in primary breast cancer : association with patients survival and other clinical and tumor features . *Int. J Cancer* , 59 , 351 – 356.
- Noronha RF and Goodall CM (1984) The effects of estrogen on single dose dimethylnitrosamine carcinogenesis in male inbred Cr1/CDF rats. *Carcinogenesis* . , 5 , 1003 – 1007.
- Phillips DH , Hewer A , Martin CN , Garmer RC and King MM (1988) Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking . , *Nature (Lond)* , 336 , 790 – 792.
- Rajah TT , Dunn ST and Pento JT (1996) The influence of antiestrogens on pS2 and cathepsin D mRNA induction in MCF-7 breast cancer cells . *Anticancer Res.* , 16 , 837 – 842.
- Risch HA , Howe GR , Jain M , Burch JD , Holowaty EJ and Miller AB (1993) Are female smokers at higher risk for lung cancer than male smokers? *Am. J Epidemiol.* , 138 , 281 – 293.
- Ryberg D , Hewer A , Phillips DH and Haugen Aage (1994) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients . *Cancer Res.* , 54 , 5801 – 5803 . Sara Brunnberg, Katarina Pettersson et al., (2003) The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as coactivator of estrogen receptor – dependent transcription. *PNAS* 100(11): 6517-6522.
- Salmi A , Ammala M and Rutanen EM (1996) Proto-oncogenes c-jun and c – fos are down – regulated in human endometrium during pregnancy : relationship to oestrogen receptor status . *Mol. Hum. Reprod.* , 2, 979 – 984.
- Sarda AK , Barnes MA and Nair RM (1980) ¹²⁵I – labeled gonadoliberin and high

specific activity and immuno reactivity : method of iodination and rapid separation .
Clin. Chem. , 26 , 573 – 578 .

Simon D. Spivack, Gregory J. Hurteau et al., (2003) Phase 1 and 2 carcinogen
metabolism gene expression in human lung tissue and tumors. *Clinical Cancer
research* 9: 6002-6011.

Sims P , Grover PL , Swaisland A , Pal K and Hewer A (1974) Metabolic activation of
benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide . *Nature* (London) , 252 , 326 – 328 .

Slaga TJ , Br Sims P , Grover PL , Swaisland A , Pal K and Hewer A (1974) Metabolic
activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide . *Nature* (London) , 252 ,
326 – 328.

Song Z, Pollenz RS. (2002) Ligand-dependent and independent modulation of aryl
hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Molecular
Pharmacology* 62(4): 806-816.

Stedman KE , Moore GE and Morgan RT (1980) Estrogen receptor proteins in diverse
human tumors . *Arch. Surg.* , 115, 244 – 248.

Stephen Safe, Mark Worme et al., (2000) Mechanism of inhibitory aryl hydrocarbon
receptor - estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *Journal of
Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 5(3): 295-306.

Stephen Safe, Mark Worme. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor – estrogen receptor α
cross-talk and mechanism of action. *Chemical Research Toxicology* 16(7): 807-816.

Stephen D. Dertinger, Daniel A. Nazarenko et al., (2001) Aryl hydrocarbon receptor
signaling plays a significant role in mediating benzo[a]pyrene- and cigarette smoke
condensate-induced cytogenetic damage in vivo. *Carcinogenesis* 22(1): 171-177.

Thakker DR , Tagi H , Levin W , Ward AW , Conney AM and Jerina DM (1985)
Polycyclic aromatic hydrocarbons : metabolic activation to ultimate carcinogens. In
Anders . MW(eds). *Bioactivation of Foreign Compounds* . Academic Press , New
York , pp. 177 – 242

Timothy P. Dalton, Alvaro Puga et al., (2002) Induction of cellular oxidative stress by

- aryl hydrocarbon receptor activation. *Chemico-Biology Interactions* 141: 77-95.
- Tora L , White C B , Tasset D , Webster N , Scheer E and Chambon P (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* , 59 , 477-487.
- Tsai M-J and O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members . *Annu. Rev. Clin. Biochem.* , 63 , 451-486.
- Valaitis J , Warren S and Gamble D (1981) Increasing incidence of adenocarcinoma the lung . *Cancer* , 47 , 1042 – 1046.
- Vseeey M , Baron J , Doll R , McPherson K and Yeates D (1983) *Br. J Cancer* , 47 , 455 – 462.
- William K. Chan, Guang Yao, et al., (1999) Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 274(17): 12115-12123.
- Wittliff JL (1984) Steroid-hormone receptors in breast cancer . *Cancer* , 53 , 630 – 643 .

八、表與圖

Table 1. Different CYP1A1 mRNA expresses among smoking male and nonsmoking male and female lung cancer patients.

	Non-smoker		Smoker	P value
	Female(%)	Male(%)	Male(%)	
CYP1A1 mRNA				
Negative (n=42)	11 (25)	23 (47)	8 (15)	0.002
Positive (n=104)	34 (75)	26 (53)	44 (85)	
P value	0.032	0.001		

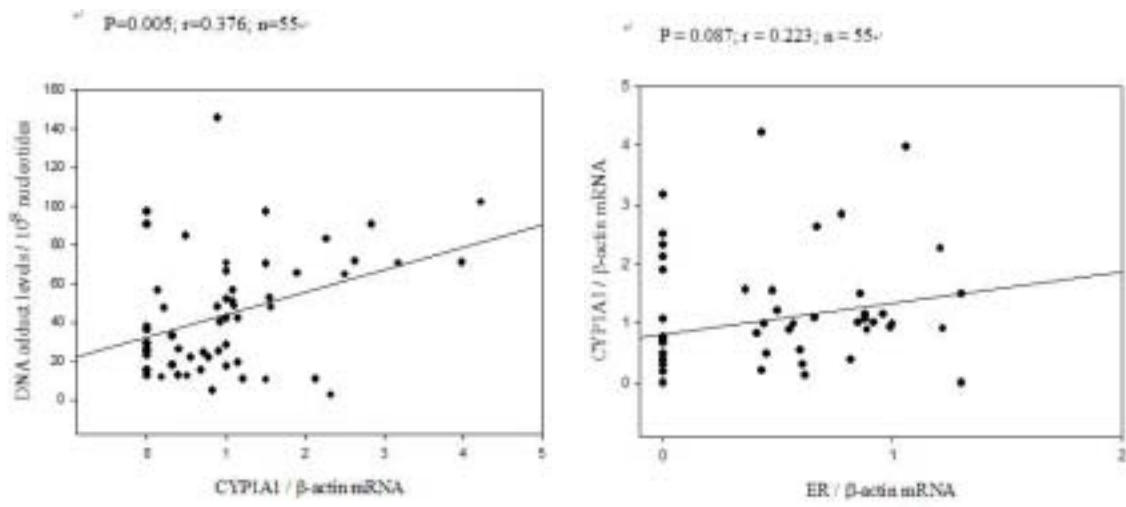


Fig 1. Correlation between CYP1A1 mRNA, ER mRNA DNA expression levels and adduct levels in tumor lung tissue from lung cancer patients

Table 2. The relationships between estrogen receptor mRNA and promoter hypermethylation in 123 NSCLC patients

Characteristics	No. of cases	Negative (%) (n=57)	Positive (%) (n=66)	<i>P</i> ^a
Gender				
Female	32	21 (66)	11 (34)	0.01
Male	91	36 (40)	55 (60)	
ER mRNA				
Negative	74	27 (36)	47 (64)	0.01
Positive	49	30 (61)	19 (39)	

^aChi-square test for categorical variables.

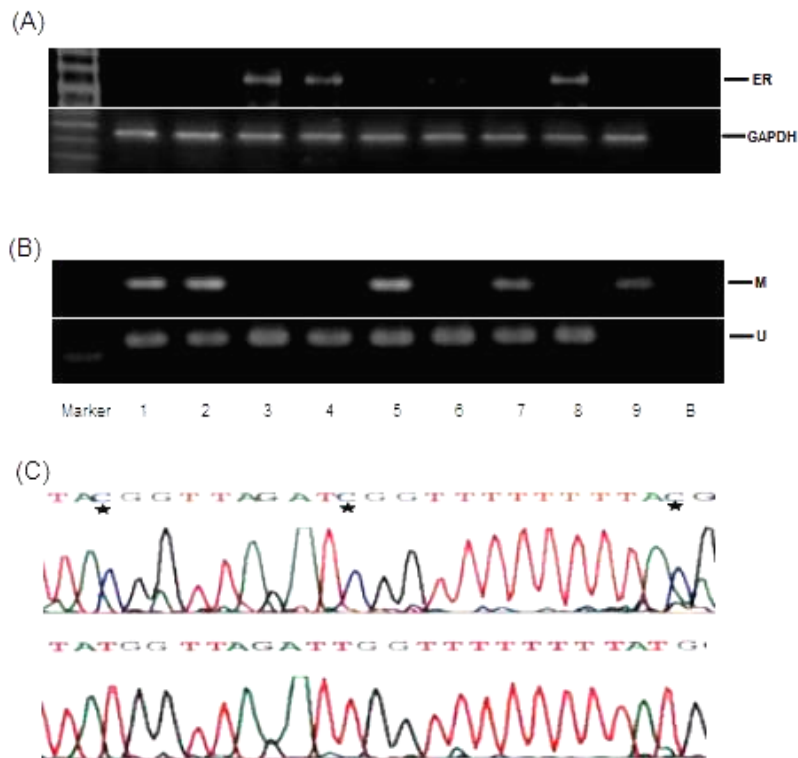


Fig. 2. Expression of estrogen receptor alpha mRNA, MSP and bisulfite sequencing analysis of ER CpG islands in human non-small cell lung cancer patients.

(A). Representative results from seven lung tumors were shown. ER and GAPDH mRNA were analyzed by RT-PCR. Lane M is 100 bp ladder marker. Lanes 3 and 4 showed a positive ER mRNA expression. Lanes 1, 2, 5, 6 and 7 showed a negative ER mRNA expression. Lane B was a negative control with cDNA template being replaced with ddH₂O. (B). The two gene methylated and unmethylated were analyzed by perform duplex PCR reactions that contained primers for both island. M indicated the reaction with primers specific for methylated DNA while U indicated the reaction with primers specific for unmethylated DNA. DNA from MCF-7 (Lane 8) and MDA-MB-231 cells (Lane 9) served as positive controls for unmethylated and methylated reactions, respectively. (C). ER CpG islands were analyzed by bisulfite sequence. ER CpG-methylated cytosines remained as cytosines (\leftrightarrow ; the upper lane). Unmethylated cytosines changed to thymidines in the PCR products whereas 5-methylcytosines remain unaltered (the lower lane).

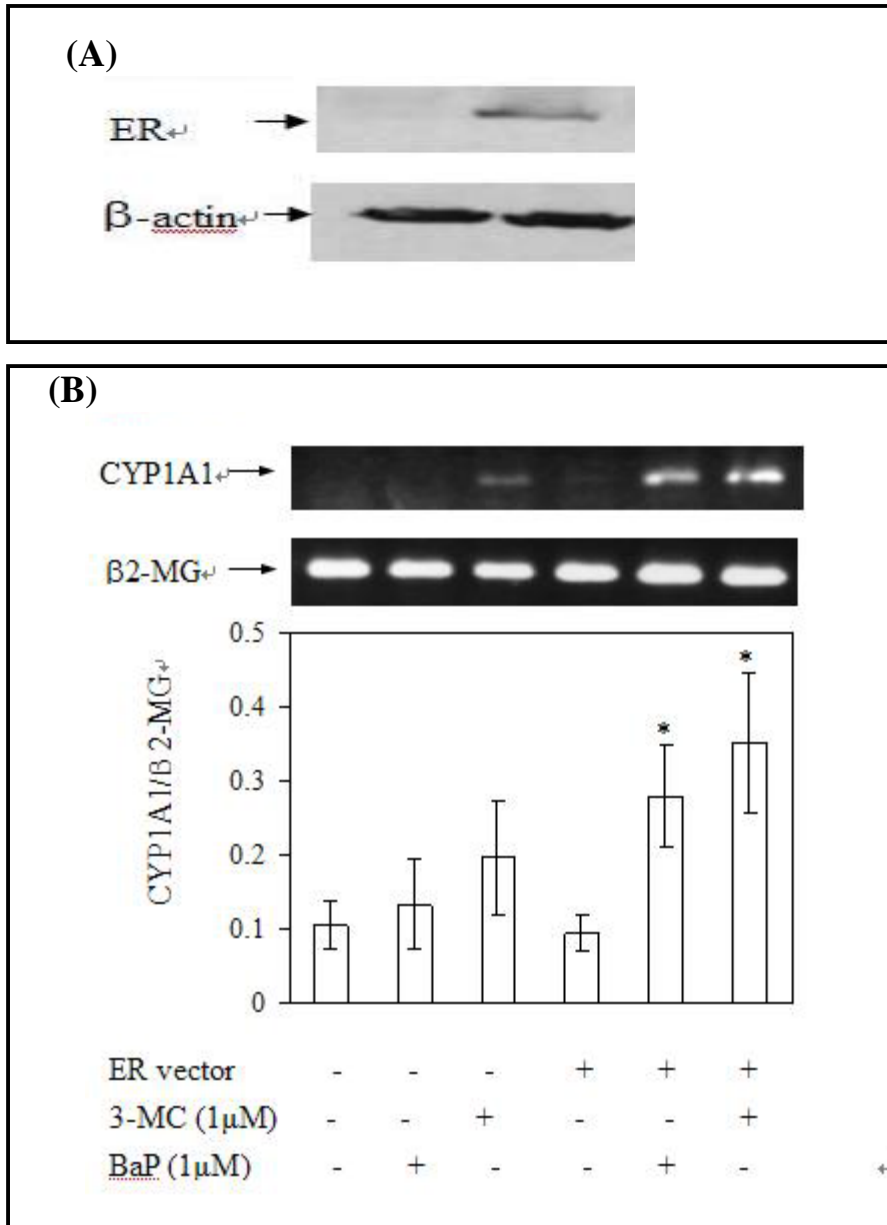


Fig. 3. Immunoblot analysis of ER protein in whole-cell of A549 cells transfected without or with ER (A). Expression of CYP1A1 in A549 cells transfected with or without estrogen receptor (ER) (B).

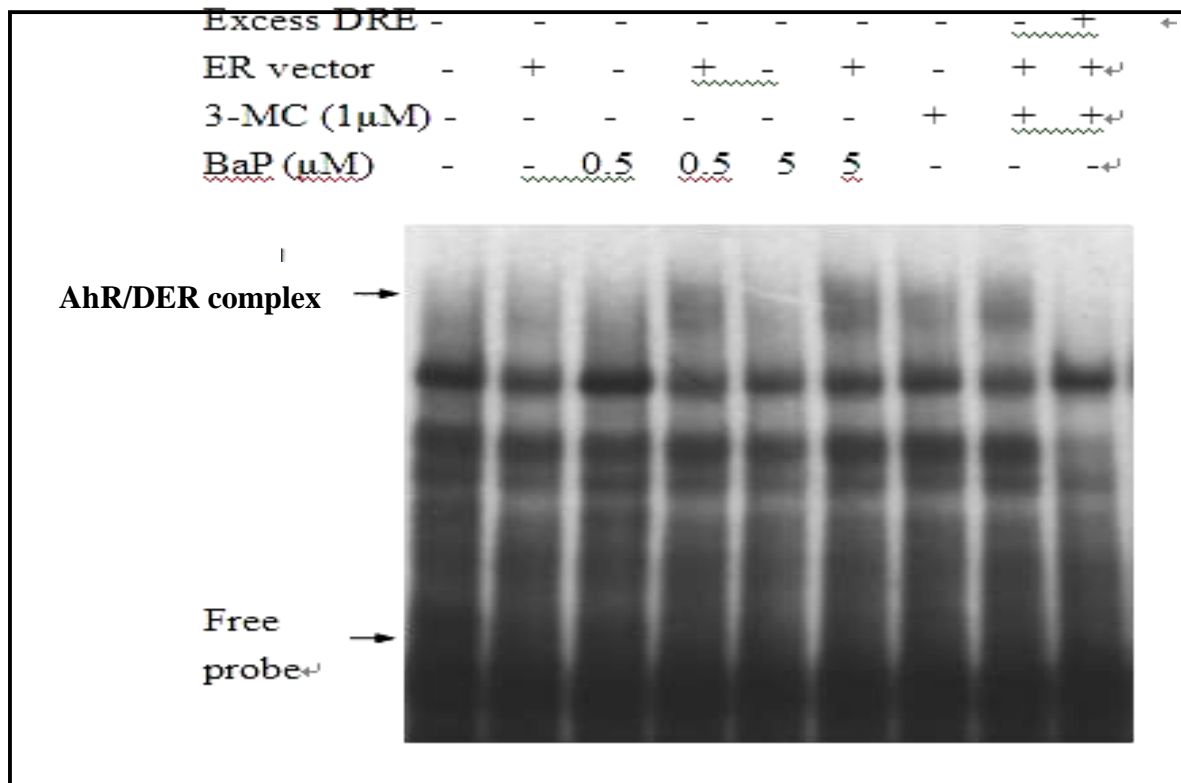


Fig. 4. Gel retardation assay of AhR binding to 32 P-DRE. A549 cells transfected without ER (A) or with ER were treated with DMSO, BaP or 3-MC for 2 h.

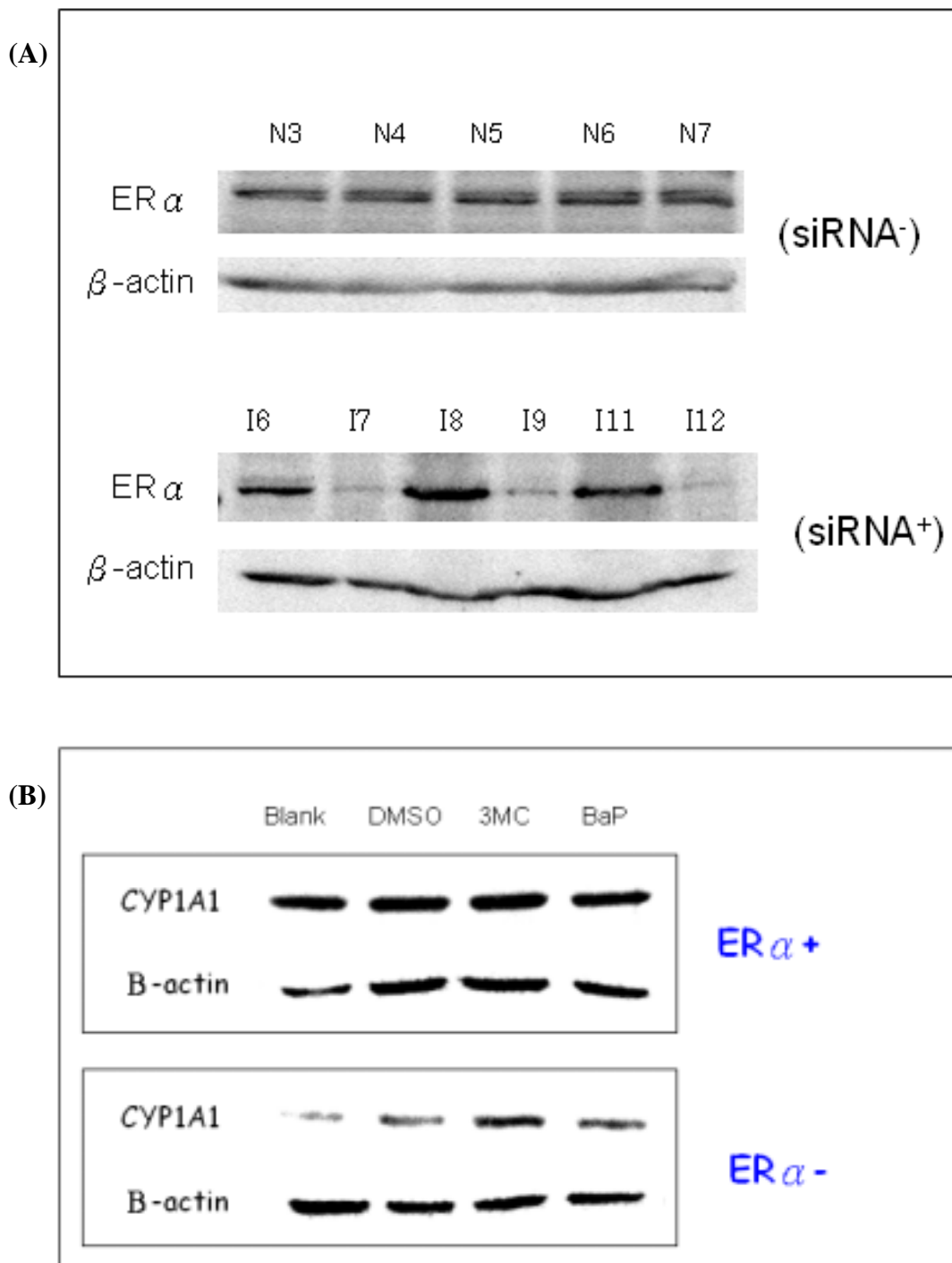


Fig. 5. (A). The immunoblot analysis of ER- α protein in the stable clone of CL5 cells transfected with empty vector or ER- α siRNA. (B). The immunoblot analysis of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) protein in the stable clone of CL5 cells with or without ER- α siRNA after the treatment of 3MC ($1 \mu\text{M}$) and BaP ($1 \mu\text{M}$) for 2 hr .

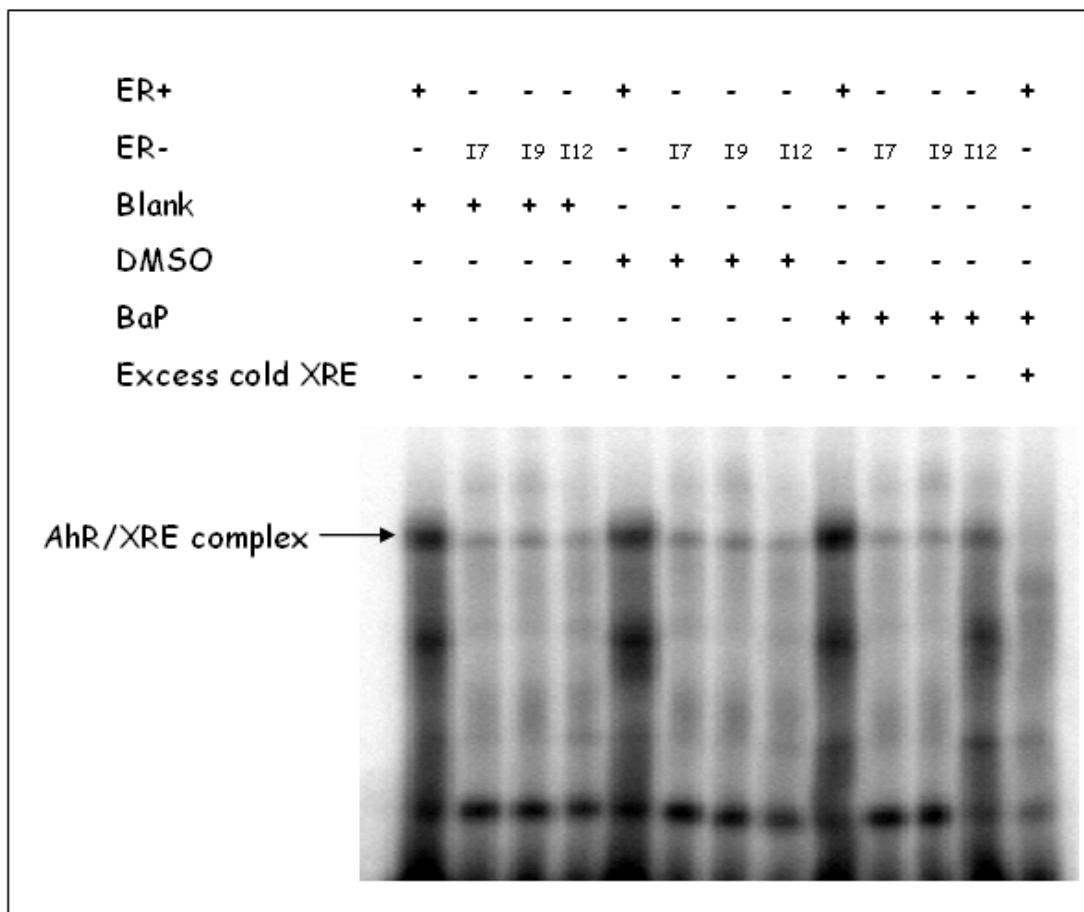


Fig. 6. Gel retardation assay of AhR binding to ^{32}P -DRE. CL5 cells transfected with ER α -siRNA (ER α $^{-}$) or not (ER α $^{+}$) after treating with DMSO and BaP (1 μM) for 2 h. (CL5 cells transfected with ER- α siRNA: I7, I9, I12)

九、計畫成果自評

本計畫之研究成果已能清楚的說明為何不抽煙女性有較高之 DNA adduct levels。雖然我們進行之研究和我們原來計畫有些出入，但是本計畫將重心轉到細胞核內，探討在有與沒有 ER 表現之肺癌細胞，CYP1A1 之蛋白表現確實會受到 unliganded ER 之影響。因此我們油費腫瘤組與細胞實驗同時證明 ER 的確會影響 AhR 之活化，而轉錄活化 CYP1A1 之基因表現。因此可說明為何女性有較高之 CYP1A1 mRNA 之表現與 DNA adduct levels。因此本計畫在分子層次提出有力證據，釐清不抽煙之女性肺癌為何會有較高之 DNA adduct levels。本成果將有助於未來預防，治療女性肺癌之形成。

3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。