

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討多環芳香烴誘發 MDM2 基因短小缺失突變的發生

Analysis of alternatively spliced mdm2 transcripts is increased by PAH

計畫編號：NSC91-2320-B040-043

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：柯俊良 中山醫學大學 毒理學研究所

## 一、 中文摘要

MDM2 基因在多種癌症組織中都有過度表現的現象，同時也發現 MDM2 基因有短小缺失的情形。先前的研究也指出，短小缺失的 MDM2 蛋白產物與多種癌症的發生有關係，例如卵巢癌、膀胱癌和乳癌；但是卻較少研究與肺癌發生之間的關係。因此，本研究計畫探討在肺癌的發生過程中是否會伴隨著 MDM2 短小缺失的情形發生，同時也進一步的探討抽煙是否與 MDM2 短小缺失的發生有關，最後利用 B(a)P 及其代謝物(BPDE)分別處理正常的肺纖維母細胞及肺癌細胞株(H1355)來加以證實 MDM2 的短小缺失與抽煙有關係。根據我們以 Nested-PCR 分析 117 位肺癌病人的檢體，發現有 31 (26.5%) 位病人具有 MDM2 短小缺失的情形。進一步利用統計的方式比較抽煙與不抽煙的肺癌病人發現，MDM2 基因在肺癌病人組織中表現的情形與性別( $p=0.008$ )及是否抽煙( $p=0.003$ )有明顯的相關性；同時在抽煙病人( $n=19$ , 44.2%)的檢體中也發現 MDM2 短小缺失的頻率較不抽煙( $n=12$ , 16.2%)的病人高；而不抽煙病人( $n=18$ )檢體中的完整 MDM2 基因表現是抽煙病人( $n=9$ )的兩倍，也就是說在台灣地區抽煙的肺癌病人具有較高 MDM2 短小缺失的機率。接著，我們分析 MRC-5 及 H1355 細胞中

中 Glutathione S transferase 的活性並以 MTS assay 分析兩株細胞對 BPDE 的細胞毒性差異，以及在處理 B(a)P 及 BPDE 之後，分析 MDM2 在 MRC-5 及 H1355 細胞中表現的情形。同時，利用專一性的抑制劑來證明經由 BPDE 所誘發的 MDM2 短小缺失-與 PI3K 及 MAPK 路徑無關。綜合以上的結果，本研究最後證實了 PAH 對於誘發 MDM2 基因發生短小缺失的情形具有潛在的危險性。

**關鍵詞：MDM2、Nested-PCR**

## Abstract

Mdm2 gene is overexpressed in several tumors and its product may be processed into different isoforms. Alternative splicing of mdm2 protein coding sequences has been documented during tumor progression in human ovarian, bladder carcinomas and breast carcinoma but few in lung cancer. The aim of this study was to determine whether alternative splicing of mdm2 occurs during lung tumorigenesis in human and whether cigarette smoking were related with alternative splicing happening. Specimens representing normal and malignant lung tissue from the human non-small cell lung cancer were examined. Of the 117 patients tested by Nested-PCR, a total of 31 (26.5%)

showed splicing variants for mdm2 gene within tumor tissue. It is very surprising, the significant association among undetectable, splicing form and full length of mdm2 gene were found on gender ( $p=0.008$ ) and smoking behavior ( $p=0.003$ ) in non-small cell lung cancer in Taiwan. The splicing frequency is significantly difference between smoker ( $n=19, 44.2\%$ ) and nonsmoker ( $n=12, 16.2\%$ ), but the number of mdm2 full-length exhibit two folds difference in non-smoker ( $n=18$ ) and smoker ( $n=9$ ), respectively. Interestingly, the smokers have more high frequently mdm2 splicing forms than nonsmoker. Further more, total GST activity in MRC-5 and H1355 cell lines were analyzed and the cytotoxicity were analyzed by MTS assay. After treat with B(a)P or BPDE, mdm2 gene expression were analyzed by Nested-PCR in MRC-5 and H1355 cell lines. Finally, we demonstrate that BPDE mediated mdm2 mRNA alternative splicing was not through PI3K and MAPK pathway by several specific inhibitors. Overall, our results suggest that an important event were about the highly potential risk of alternative splicing after exposure to PAH.

## 二、緣由與目的

近年來，肺癌在台灣是增加最快速的癌症之一，就其增加的速率估計，在二十一世紀初期已成為國人發生率最高且預後相當差的癌症。而在近代流行病學統計及分子醫學的研究中也發現，肺癌的發生與長期暴露二手菸有關，同時燃燒的香菸所產生的多環芳香烴類物質會進一步的造成基因的突變或 DNA 傷害[2]，進而導致癌症的發生。癌症的發生似乎與一些致癌基因的活化有關，其中過度表現的致癌基因 MDM2 也常被發現

於癌症病患的組織中[5]，其重要的危險因子有待探討，因此要如何預防及延緩癌症的發生是現今最不可容緩的事情。

有鑒於肺癌對國人所造成的傷害，因此本實驗室進一步的探討外在環境刺激與分子致癌機轉在癌症發生時所扮演的角色，以期對癌症的治療與預防能有所助益。先前的研究發現在肺癌病人的癌化組織中有短小缺失的 MDM2 基因表現，因此本實驗進一步的探討抽煙是否與 MDM2 短小缺失的發生有關。

MDM2 已被證實與癌症生成有關[7]，動物實驗也已證實抽煙會導致肺癌的發生[10]；然而香菸中的 B(a)P 及其代謝物-BPDE 是否會在肺癌生成過程中造成 MDM2 發生短小缺失，至今仍然未知。因此，本研究計畫以 Nested-PCR 分析 117 位肺癌病人的癌化組織中 MDM2 基因表現的情形，並進一步的與病人的性別、年齡、抽煙習慣、癌症分期、等作相關性比較，發現有抽煙習慣的肺癌病人組織中有較高比率的短小缺失 MDM2 的表現。接著再利用細胞的模式進行分析，以探討當細胞暴露於外在環境中的有害因子時（例如 B(a)P 或 BPDE），細胞內的 MDM2 基因有何變化，同時也將細胞處理不同的訊息傳遞路徑之專一性抑制劑，以進一步的釐清 B(a)P 或 BPDE 誘發 MDM2 發生短小缺失的確切機轉。

在分析正常的肺部纖維母細胞（MRC-5）及肺部的癌化細胞（H1355）中的 GST 活性時，發現兩株細胞的 GST 活性有明顯的差異，同時將兩株細胞處理不同濃度的 BPDE 後，並以 MTS 分析 BPDE 對兩株細胞的細胞毒性有何不同，發現在有高度 GST 表現的 MRC-5 細胞株，其能夠抵抗經由 BPDE 所造成的 DNA-damage；但 H1355 並無法移除 BPDE 所造成的 DNA 傷害。因此，本研究主要證實細胞暴露了多環芳香烴會造成 MDM2 之短小缺失情形的發生。

### 三、材料與方法

#### 1. Nested-PCR

將自病人取得的癌化組織進行 RNA 萃  
取及 cDNA 合成後，進一步利用 Matsumoto  
et al. (1998) 的實驗方法設計出  
oligodeoxynucleotide primer 及 PCR 條件，  
並加以修飾所得。所採用的 primers 條件如  
下：

External sense primer :

5'-CTGGGGAGTCTTGAGGGACC-3'

External antisense primer :

5'-CAGGTTGTCTAAATTCCTAGGG-3'

Internal sense primer :

5'-CGCGAAAACCCCGGATGGTGAG-3'

Internal antisense primer :

5'-CTCTTATAGACAGGTCAACTA-3'。

先利用 External primers 作第一次 PCR，  
PCR 反應條件如下：denature: 95°C, 30 秒；  
annealing: 55°C, 30 秒及 elongation: 68°C，  
2 分鐘，重複上述步驟 25 次，最後以 68°C  
反應 6 分鐘。第二次的 PCR 則取第一次的  
產物 1  $\mu$ l 並採用 Internal primers，以同樣的  
反應溫度及時間重複上述的步驟 33 次。最  
後利用 1% agarose gel 進行分析。

#### 2. 統計分析

以 SPSS 統計軟體進行 MDM2 mRNA 表  
現的統計分析。以卡方檢定 ( $\chi^2$ -test) 來  
分析其分佈上的差異，並進一步的考慮其他  
干擾因子，如抽煙、性別、癌症分期或年齡  
等干擾其基因表現的情形。

#### 3. Total GST 活性測定

將欲測定的兩株細胞 (MRC-5 及 H1355)  
以細胞刮勺將細胞刮下，並以磷酸緩衝溶液  
( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 M;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1M; pH 6.5)  
將細胞懸浮。接著以超音波將細胞破碎，並  
利用 Bio-Rad 方法測定蛋白濃度。最後取

20  $\mu$ l (20  $\mu$ g) 與 CDNB buffer (60  $\mu$ l) (先  
取 2 ml 的 95% 酒精溶解 CDNB 粉末，經由  
微微加熱後補磷酸緩衝液致體積 50 ml) 及  
GSH buffer (80  $\mu$ l) 反應，以每 10 秒鐘測  
定一次 (OD 340) 吸光值變化的方式，測  
定 1 分鐘內吸光值的變化程度。

#### 4. MTS Assay

本實驗是採用由 Promega 所推出的一套  
CellUiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell  
Proliferation Assay 來進行細胞毒性試驗分  
析，其實驗步驟如下：

1. 首先將細胞培養於 96 孔盤上  
( $5 \times 10^4$ /well)，待培養 18 小時後進行細  
胞加藥實驗。
2. 分別將兩株細胞處理不同濃度的 BPDE  
及 Taxol，待 24 小時後直接將 20  $\mu$ l 的  
MTS/PMS solution (取 0.92 mg/ml 的  
PMS, 100  $\mu$ l 加入 2ml 的 2mg/ml 的 MTS)  
加至每一個 well 內。
3. 於 37°C 細胞培養箱中反應 2 小時後，測  
定波長 490 nm 的吸光值。

最後將所得的吸光值變化繪製成濃度  
與存活率的曲線圖，藉以比較 MRC-5 及  
H1355 對於 BPDE 的細胞毒性差異。

#### 5. BPDE 的配製

BPDE 購自 NCI，在配製 BPDE 之前，  
必須要先配製溶解 BPDE 的溶液，因為  
BPDE 非常不穩定，所以必須要將其溶  
於含有 5% triethylamine (TEA, 99.5%)  
及 95% tetrahydrofuran (THF) 的混合  
液中。同時其混合液的 pH 值不可低於  
6.5，因為太低的 pH 值會造成 BPDE 被  
水解。最後將 BPDE 配製成 2 mM 的濃  
度。

### 四、結果與討論

在細胞受到 B(a)P 攻擊而造成 DNA 傷害  
時，會引起細胞周期的停止；但在這個過程  
中發現 MDM2 的 mRNA 表現量被增加 [4]。

目前的研究已經證實，香菸中含有許多致癌物質；而這些致癌物質經由轉換或代謝後會和 DNA 反應進而造成 DNA adduct，最後導致許多基因的不穩定並造成肺癌的發生。在我們的研究中指出，抽煙的肺癌病人 (44.2%) 的 MDM2 基因相較於不抽煙的肺癌病人 (16.2%) 有較高短小缺失的比率 (表一)，而這個結果也指出香菸中的某些物質有可能會造成 MDM2 基因發生短小缺失的情形。

因此，在接下來的研究中我們發現當肺癌細胞 (H1355) 處理 B(a)P 及其代謝物-BPDE 後，會造成 MDM2 的短小缺失 (圖一)。而在體外培養的人類肝臟細胞也發現類似的情形，當細胞處理  $17\beta$ -estradiol 或  $17\alpha$ -ethinylestradiol 後，細胞中的 MDM2 也會有短小缺失的情形 [8]。此外，我們將自 H1355 細胞處理 B(a)P 及 BPDE 後而得到的短小缺失的 MDM2 基因進一步的定序，發現似乎 BPDE 或 B(a)P 對於 MDM2 基因序列中的某些序列有專一性，也就是說 BPDE 或 B(a)P 可辨認特殊的 DNA 序列進而使得 MDM2 基因發生短小缺失的情形 (圖二)。而另人驚訝的，經由 H1355 細胞處理 BPDE- $2\mu\text{M}$  後所得到的 MDM2 基因，我們發現和先前在 soft tissue sarcoma 中所發現之短小缺失的 MDM2 基因序列一樣 [11]；但在肺癌病人的組織中則是第一次被發現。

雖然基因的短小缺失形式已經在許多基因表現模式中被描述 [1]，但對於調控基因發生短小缺失的機轉至今還不清楚。有研究指出 mRNA 發生短小缺失與 DNA damage response kinase ATR 有關，而這種 kinase 屬於 PIK-like family [6]。此外，在 ataxia-telangiectasia 細胞中發現，BPDE 會造成 Chk1 的磷酸化及 S-phase 的停止 [9]。同時 BPDE 會活化 MTK1/MEKK4 (一種 MAP kinase kinase kinase)，並進而調控 p38 及 JNK 的活化 [12, 13]。所以，我們進一步的假設 MDM2 基因的短小缺失情形是透過訊息傳遞路徑所調控。為了要釐清訊息傳遞路徑中的何種因子調控 MDM2 基因的短小

缺失，我們處理了多種專一性的抑制劑來釐清問題所在；我們選用了 LY294002 (PI3-Kinase inhibitor,  $50\mu\text{M}$ )、Wortmannin (PI3-Kinase inhibitor,  $0.5\mu\text{M}$ )、PD98059 (MAPK/ERK Kinase inhibitor,  $20\mu\text{M}$ )、SB203580 (p38 inhibitor,  $20\mu\text{M}$ ) 及 SB216763 (Glycogen synthesis kinase inhibitor,  $0.5\mu\text{M}$ )。經由 Nested-PCR 分析的結果顯示 (圖三)，在處理了各種抑制劑之後並不能有效的抑制 MDM2 基因的短小變異情形，也就是說經由 BPDE 或 B(a)P 所造成的短小缺失情形並非透過上述的訊息調控路徑所調控。

在關於日本肺癌的研究曾指出，香菸中的致癌物質會使得肺部的解毒基因 (GST) 發生基因多行性的變異而增加肺癌的罹換機率 [14]。BPDE-DNA adduct 的形成會造成抑癌基因-p53 的突變；同時也有可能引起經由抽煙所造成的肺癌，而 CYP1A1 and GST 的酵素活性是結定多少量的 BPDE-DNA adduct 會造成肺癌發生的關鍵步驟 [15]。所以，在本實驗中也分析了正常纖維母細胞及肺癌細胞中 GST 的酵素活性，希望能進一步的了解經由抽煙所造成的肺癌發生是否與 GST 基因的異常有關，而透過分析細胞內 total GST 的活性也發現，在 MRC-5 細胞內有大量的 GST 活性表現，同時在經由序列分析後也發現其細胞內主要是以 GST-M2 的表現為主；而在 H1355 細胞內則是以 GST-M4 的表現為主。同時，在活性測定的結果也發現肺癌細胞株 (H1355) 相較於 MRC-5 細胞株並沒有 GST 的酵素活性 (圖四)，而此結果也和前人的研究相符。

既然 MRC-5 和 H1355 細胞株的 GST 酵素活性有這麼明顯的差異，因此在進一步的分析兩株細胞對於 BPDE 所造成的細胞毒性是否有差異，再細胞經由 BPDE 處理 24 小時後；MTS 的結果指出 MRC-5 可有效的抵抗 BPDE 所造成的細胞毒性，而 H1355 在經由 BPDE 處理後 24 小時，高劑量的 BPDE ( $2\mu\text{M}$ ) 幾乎造成細胞大量死亡 (圖五)。

本研究提出 MDM2 基因在肺癌病人組織中的短小缺失情形與長期暴露香菸中的多環芳香烴成分有關，而細胞暴露 BPDE 或 B(a)P

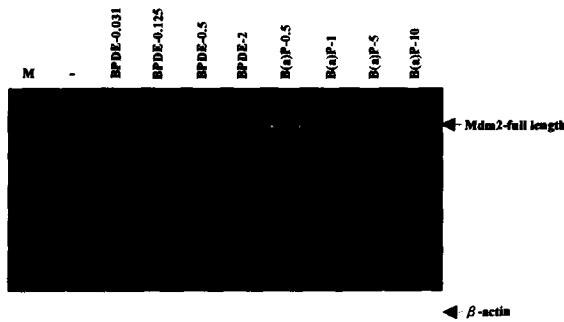
則會誘發 MDM2 mRNA 發生短小缺失的情形。在本篇的研究結果也和多個研究室的想法一致，也就是說當暴露到多種 DNA agents 時會誘發 MDM2 基因的表現。而先前也有一些研究的結果可用來解釋 BPDE 所誘發的 MDM2 基因發生短小缺失的情形。首先，經由代謝 B(a)P 之後所形成的 DNA adduct 會阻斷人類的 RNA polymerase II 在序列上及 stereochemistry dependent manner 的延長作用[3]。換句話說，若是 genome 發生傷害，會增加基因在複製時的錯誤機率，造成基因的突變進而啟動了癌症初期的形成。第二點，heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/B2 (hnRNP A1/B2) 是 pre-mRNA 發生短小缺失的啟動開關，而在近代的研究也指出 hnRNP A1/B2 參與了癌症形成的初期。因此，BPDE 也有可能藉由影響 hnRNP A1/B2 的表現進而造成 MDM2 基因的短小缺失情形發生。

#### 五、參考文獻

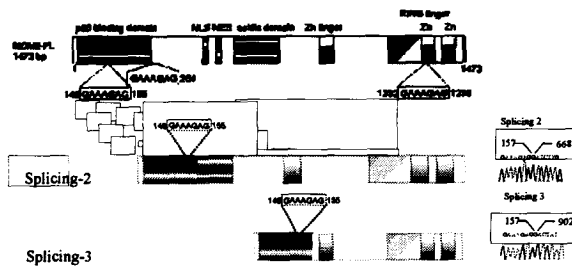
1. Modrek, B. and C. Lee, *A genomic view of alternative splicing*. Nat Genet, 2002. **30**(1): p. 13-9.
2. Weston, A., et al., *Fluorescence and mass spectral evidence for the formation of benzo[a]pyrene anti-diol-epoxide-DNA and -hemoglobin adducts in humans*. Carcinogenesis, 1989. **10**(2): p. 251-7.
3. Perlow, R.A., et al., *DNA adducts from a tumorigenic metabolite of benzo[a]pyrene block human RNA polymerase II elongation in a sequence- and stereochemistry-dependent manner*. J Mol Biol, 2002. **321**(1): p. 29-47.
4. Vaziri, C. and D.V. Faller, *A benzo[a]pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53-independent G1 arrest in 3T3 fibroblasts*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2762-9.
5. Landers, J.E., et al., *Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells*. Oncogene, 1994. **9**(9): p. 2745-50.
6. Mannino, J.L., et al., *Evidence for alternate splicing within the mRNA transcript encoding the DNA damage response kinase ATR*. Gene, 2001. **272**(1-2): p. 35-43.
7. Hayashi, Y., *[Mechanism of tumorigenesis caused by tumor suppressor gene]*. Nippon Rinsho, 2000. **58**(6): p. 1231-6.
8. Schlott, T., et al., *Detection of MDM2 alterations in cultured human hepatocytes treated with 17beta-estradiol or 17alpha-ethinylestradiol*. Anticancer Res, 2002. **22**(3): p. 1545-51.
9. Guo, N., D.V. Faller, and C. Vaziri, *Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive*. Cell Growth Differ, 2002. **13**(2): p. 77-86.
10. Rubin, H., *Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates*. Carcinogenesis, 2001. **22**(12): p. 1903-30.
11. Bartel, F., et al., *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): p. 168-75.
12. Mita, H., et al., *Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(13): p. 4544-55.

13. Wang, A., et al., *Response of human mammary epithelial cells to DNA damage induced by BPDE: involvement of novel regulatory pathways.* Carcinogenesis, 2003. 24(2): p. 225-34.
14. Kiyohara, C., et al., *Polymorphism in GSTM1, GSTT1, and GSTP1 and Susceptibility to Lung Cancer in a Japanese Population.* Asian Pac J Cancer Prev, 2000. 1(4): p. 293-298.
15. Alexandrov, K., et al., *CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation.* Carcinogenesis, 2002. 23(12): p. 1969-77.

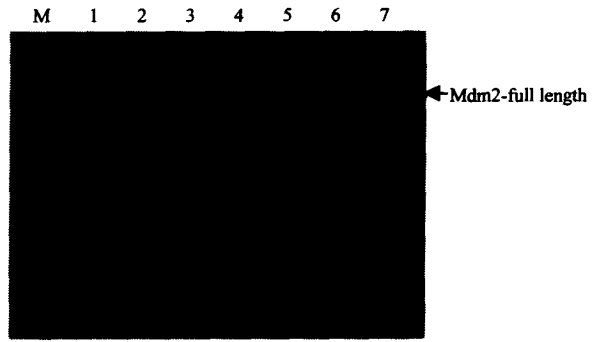
六、圖表



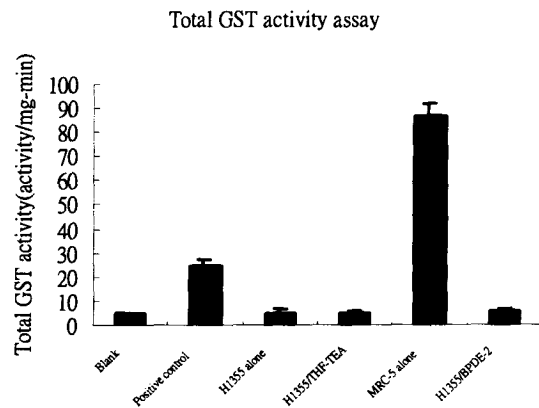
圖一、H1355 細胞在處理 BPDE 及 B(a)P 後，誘發 MDM2 基因短小缺失情形之電泳凝膠分析圖



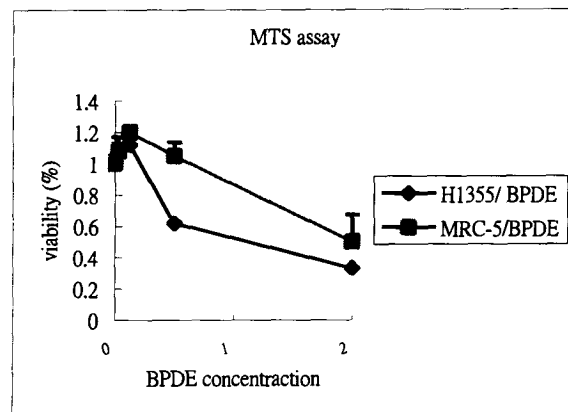
圖二、BPDE 或 B(a)P 辨認特殊的 DNA 序列進而使得 MDM2 基因發生短小缺失的情形



圖三、將 H1355 細胞處理專一性抑制劑之後，再處理 BPDE-2µM，待四小時後分析 MDM2 基因變化的電泳凝膠圖。Lane1 到 lane7 依序為 H1355 alone、BPDE-2µM、BPDE-2µM+ LY294002、BPDE-2µM+ Wortmannin、BPDE-2µM+ PD98059、BPDE-2µM+ SB203580 及 BPDE-2µM+ SB216763



圖四、MRC-5 及 H1355 細胞株之 GST 活性分析



圖五、MRC-5 及 H1355 細胞株之細胞毒性分析結果

Table 1. Relationships among mdm2 splicing, clinicopathologies, gender and smoking behavior with Nested RT-PCR.

Parameter	Total no.	Mdm2			p-Value
		Undetectable (%)	Splicing form (%)	Full length (%)	
<b>Age (yr)</b>					
≤65	57	31(54.3%)	15(26.3%)	11(19.3%)	0.596
>65	60	28(46.6%)	16(26.6%)	16(26.6%)	
<b>Gender</b>					
Female	42	26(61.9%)	4(9.5%)	12(28.6%)	0.008
Male	75	33(44%)	27(36%)	15(20%)	
<b>Grade</b>					
Well	4	2(50%)	1(25%)	1(25%)	0.335
Moderate	70	37(52.8%)	14(20%)	19(27.1%)	
Poor	43	20(46.5%)	16(37.2%)	7(16.2%)	
<b>Tumor stage</b>					
I	40	20(50%)	12(30%)	8(20%)	0.766
II & III	77	39(50.6%)	19(24.6%)	19(24.6%)	
<b>Tumor type</b>					
AD	74	38(51.3%)	16(21.6%)	20(27%)	0.268
SQ	42	21(50%)	15(35.7%)	7(16.6%)	
<b>T value</b>					
1&2	91	45(49.4%)	24(26.3%)	22(24.1%)	0.863
3&4	26	14(53.8%)	7(26.9%)	5(19.2%)	
<b>N-value</b>					
0	50	25(50%)	17(34%)	8(16%)	0.153
1,2&3	67	34(50.7%)	14(20.9%)	19(28.3%)	
<b>Smoking</b>					
Non-smoking	74	44(59.4%)	12(16.2%)	18(24.3%)	0.003
Smoker	43	15(34.8%)	19(44.2%)	9(20.9%)	