

附件一

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

(計畫名稱)

氣體性氮氧化物(NO_x)致肺病變機轉之研究(二)NO_x促進人類

肺纖維細胞增生及細胞週期擴展作用

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2320-B-040-051

執行期間：91年8月1日至92年7月31日

計畫主持人：王朝鐘

共同主持人：

計畫參與人員：

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：中山醫學大學生化所

中華民國九十二年十月一日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

氣體性氮氧化物(NO_x)致肺病變機轉之研究(二)NO_x 促進人類肺纖維細胞增生及細胞週期擴展作用

Tumor promoting effect and mechanisms of action of gaseous nitrogen oxides (II)

計畫編號：NSC 91-2320-B-040-051

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

計畫主持人：王朝鐘 中山醫學大學生化所 wcj@csmu.edu.tw

一、中文摘要

氣體性氮氧化物(NO_x)是室內外空氣中重要的污染物質之一。許多研究指出，NO_x 氣體經由其氧化特性及其自由基來造成肺組織的傷害。在我們先前的研究已證實 NO_x 氣體可誘導人類肺纖維細胞 MRC-5 的增生。在本研究結果發現，NO_x 氣體誘導人類肺纖維細胞 MRC-5 的增生是經由活化 cyclin-cdk complexes 進而磷酸化 Rb 蛋白。本研究利用西方墨點法與免疫沉澱法證實：NO_x 氣體處理人類肺纖維細胞 MRC-5 後 9 小時可誘使細胞中 cyclinA/cdk2、cyclinD1/cdk4、cyclinE/cdk2 蛋白增加表現，Rb 蛋白磷酸化增加，並且使 cdk 抑制蛋白 p27、p16 表現下降。這些結果顯示 NO_x 氣體誘導人類肺纖維細胞 MRC-5 的增生是經由活化細胞週期蛋白 cyclin-cdk complexes，進而磷酸化 Rb 蛋白，並且抑制 cdk 抑制蛋白。總而言之，NO_x 氣體經由刺激細胞週期進行而誘導人類肺纖維細胞的增生可能與空氣污染物質刺激肺部纖維化有關。

二、英文摘要

Nitrogen oxides (NO_x) are important indoor and outdoor air pollutants. Many studies have indicated that NO_x gas causes lung tissue damage by its oxidation properties and its free-radicals. In a previous study we demonstrated that NO_x gas induced proliferation of human lung fibroblast MRC-5 cells. In this study we show that NO_x gas stimulates MRC-5 cell proliferation by Rb phosphorylation via activation of cyclin-cdk complexes. Western blot and immunoprecipitation data showed that NO_x gas increased the expressions of cyclinA/cdk2, cyclinD1/cdk4 and cyclinE/cdk2 complexes in the cells 9 h after treatment. The levels of phospho-Rb were also increased and cdk inhibitors (CKIs) p27 and p16 were apparently decreased. These data suggested that NO_x gas stimulates cell cycle progression by Rb phosphorylation via activation of cyclin-cdk complexes and inhibition of CKIs. In conclusion, the NO_x gas induced lung fibroblast cell proliferation by stimulation of cell cycle progression may contribute to lung

fibrosis by NOx pollutants.

三、緣由與目的

氣體性氮氧化物(NOx)廣泛存在於汽機車排放廢氣、燃燒產生之廢氣、火力發電、室內烹煮燃燒瓦斯產生之廢氣及所有燃燒石油或瓦斯所產生之空氣污染物質之中(1,2)。另一個含有氣體性氮氧化物(NOx)的是香菸中的煙霧，它最高含有 100ppm 濃度的 NO(3)。近年來有許多研究指出，NO、NO₂ 會影響人體的生化代謝(4)。此外，一些臨床的研究指出，人體暴露在不同濃度的 NOx 下會造成肺部組織的傷害(5,6)。而在肺部組織受傷修復過程中，表皮細胞與間質細胞(如纖維細胞)之間的交互作用扮演一個重要的角色(7)。雖然有研究指出 NOx 會造成呼吸道上皮細胞損傷，但是最近研究指出在肺臟移植後，NO 可破壞表皮組織與刺激纖維細胞活化(8)。體內內生性 NO 的產生是經由 NO 合成酶(NOS)所合成，我們先前的研究指出，氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞 MRC-5 活化刺激分泌型的 NOS(iNOS)(9)；許多研究證實 iNOS 可促進細胞的增生(10~13)，但是並沒有研究針對於氣體性氮氧化物(NOx)刺激活化 iNOS 並活化細胞週期的進行。

在真核細胞中，細胞週期的進行與細胞增生有密切關係(14)，而調控脊椎動物細胞週期需要一些蛋白因子參與，包含調節蛋白(cyclin)與催化調節蛋白的蛋白酶(cdk)，它們彼此間會形成複合體來調控細胞週期。在細胞週期由 G₀/G₁ 進入 S(DNA 合成)期需要許多因子參與，包括活化 cyclinA/cdk2、cyclinD1/cdk4、cyclinE/cdk2 蛋白增加表現與 Rb 蛋白磷酸化增加等等都可刺激細胞週期由 G₀/G₁ 進入 S 期(15)。而細胞週期由 G₀/G₁ 進入 S 期時 Rb 蛋白會磷酸化而與 E2F(轉錄因子)分離(16,17)，此時 E2F 會活化 DNA 複製激酶(dihydrofolate reductase, thymidine

kinase, DNA polymerase α)(18)而增加 DNA 複製。此外，抑制 G₀/G₁ cyclin-cdk 複合體的抑制蛋白 cdk inhibitory proteins (CKIs)包含 p27、p21、p16 蛋白等等也是參與細胞週期進行的重要因子(19~21)。

在我們先前的研究之中已證實氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞 MRC-5 的增生是經由活化刺激分泌型的 NOS(iNOS)(22)。因此在本研究中，我們想要了解氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞 MRC-5 增生與細胞週期蛋白的相關性，進而了解氣體性氮氧化物(NOx)與人類肺纖維化的相關性。

四、結果

(一) 氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞增生的相關性

由圖一(A)結果顯示：經由 MTT 方法偵測細胞存活情形發現，在處理 1 μ M 濃度的飽和氣體氮氧化物溶液下 24、48、72 小時發現肺纖維細胞數目比控制組多；由圖一(B)結果顯示：經由流式細胞儀分析細胞週期，在處理 1 μ M 濃度的飽和氣體氮氧化物溶液下 12 小時 S 期增加 19%、24 小時 S 期增加 25%。而這些結果顯示氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞增生。

(二) 氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞 cyclins 與 cdk 表現

由圖二結果顯示：經由西方末點法分析，在處理 1 μ M 濃度的飽和氣體氮氧化物溶液下，氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞 cyclinA、cyclinD1、cyclinE 表現增加(在 9 小時有最大表現量)3.5、6、5.5 倍(圖二 A)；氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞 cdk2 與 cdk4 表現增加(在 9 小時有最大表現量)3 與 2.8 倍(圖二 B)。

(三) 氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞 cyclin/cdk 結合表現

在圖三中發現：經由西方末點法分析，在處理 1 μ M 濃度的飽和氣體氮氧化物溶液下，氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞

(四) 氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞影響 CKIs 表現

圖四結果發現：經由西方末點法分析，在處理 1 μ M 濃度的飽和氣體氮氧化物溶液下，氣體性氮氧化物(NOx)可抑制人類肺纖維細胞 CKIs 表現，其中以影響 p27 及 p16 蛋白最為明顯(圖四)。

(五) 氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞 Rb 磷酸化表現

圖五和圖六結果顯示：經由西方末點法分析，在處理 1 μ M 濃度的飽和氣體氮氧化物溶液下，氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞 cyclinA/cdk2 、 cyclinD1/cdk4 、 cyclinE/cdk2 結合表現增加是經由磷酸化 Rb(在 9 小時有最大表現量)。

五、討論

在本研究中証實，氣體性氮氧化物(NOx)刺激人類肺纖維細胞 MRC-5 增生與細胞週期蛋白表現。如圖七總圖，NOx 氣體處理人類肺纖維細胞 MRC-5 後可誘使細胞中 cyclinA/cdk2 、 cyclinD1/cdk4 、 cyclinE/cdk2 蛋白增加表現，Rb 蛋白磷酸化增加，並且使 cdk 抑制蛋白 p27、p16 表現下降，而使細胞週期由 G₀/G₁ 進入 S 期。

NOx 氣體存在於空氣污染物質及香菸煙霧之中(23~25)，以吸煙者族群中發現香菸能導致肺纖維化(26)，環境中空氣污染物質能誘導肺細胞表現 iNOS(27)，而在老鼠肺纖維化中發現免疫因子能誘發 iNOS 表現並促進肺細胞增生(28)。在我們先前研究已發現，氣體性氮氧化物(NOx)可刺激人類肺纖維細胞 MRC-5 的增生是經由活化刺激分泌型的 NOS(iNOS)(22)。纖維細

cyclinA/cdk2 、 cyclinD1/cdk4 、 cyclinE/cdk2 結合表現增加(在 9 小時有最大表現量)3.55、2.63、2.05 倍(圖三)。

胞 MRC-5 的增生可能是經由直接(NOx 氣體)或是間接(NOx 氣體活化 iNOS)來影響。

總言之，NOx 氣體處理人類肺纖維細胞 MRC-5 後可誘使細胞中 cyclinA/cdk2 、 cyclinD1/cdk4 、 cyclinE/cdk2 蛋白增加表現，Rb 蛋白磷酸化增加，並且使 cdk 抑制蛋白 p27、p16 表現下降，而使細胞週期由 G₀/G₁ 進入 S 期這結果也許可用來解釋 NOx 與 NO 是肺纖維化過程的參與者，並且參與在肺纖維化的病理過程中。

六、計畫成果自評：

本計畫之目標為找出氣體性氮氧化物(NOx)致肺病變機轉之研究，研究成果中顯示，NOx 氣體可經由活化細胞週期蛋白來刺激人類肺纖維細胞 MRC-5 的增生，藉此參與在肺纖維化的病理過程之中。

本計畫研究成果已完成，目前正在積極撰寫投稿當中。

七、參考文獻

1. Samet, J.M., Marbury, M.C., and Spengler, J.D. (1987). Health effects and sources of indoor air pollution, Part I. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 1486-1508.
2. Leaderer, B. (1982). Air pollutant emissions from kerosene space heater. *Science* **218**, 1113-1116.
3. Norman, V., and Keith, C.H. (1965).

- Nitrogen oxides in tobacco smoke. *Nature* **205**, 915-916.
4. World Health Organization (1977). Environmental Health Criteria 4, Oxides of nitrogen. WHO, Geneva.
 5. Morrow, P.E. (1984). Toxicological data on NO₂: an overview. *J. Toxicol. Environ. Health* **13**, 205-227.
 6. Samet, J.M., and Utell, M.J. (1990). The risk of nitrogen dioxide: what we have learned from epidemiological and clinical studies? *Toxicol. Indust. Health* **6**, 247-262.
 7. Young L., Adamson I.Y. (1993). Epithelial-fibroblast interactions in bleomycin-induced lung injury and repair. *Environ Health Perspect.* **101**, 56-61.
 8. Romanska H.M., Polak J.M., Coleman R.A., James R.S., Harmer D.W., Allen J.C., Bishop A.E. (2002) iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol.* **197**, 372-379.
 9. Hsieh, Y.S., Wang, H.C., Tseng, T.W., Chang, W.C., and Wang, C.J. (2001). Gaseous nitric oxide-induced 8-nitroguanine formation in human lung fibroblast cells and cell-free DNA. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 210-216.
 10. Robbins R.A., Barnes P.J., Springall D.R., Warren J.B., Kwon O.J., Buttery L.D., Wilson A.J., Geller D.A., Polak J.M. (1994). Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **203**, 209-218.
 11. Asano K., Chee C.B., Gaston B., Lilly C.M., Gerard C., Drazen J.M., Stamler J.S. (1994). Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10089-93.
 12. Guo, F.H., De Raeve, H.R., Rice, T.W., Stuehr, D.J., Thunnissen, F.B., and Erzurum, S.C. (1995). Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7809-7813.
 13. Romanska H.M., Polak J.M., Coleman R.A., James R.S., Harmer D.W., Allen J.C., Bishop A.E. (2002) iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol.* **197**, 372-379.
 14. Pardee, A.B. (1989). G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
 15. Weinberg R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
 16. Wang J.Y., Knudsen E.S., Welch P.J. (1994). The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res* **64**, 25-85.
 17. Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L. (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J*

- Cell Physiol* **173**, 233-236.
18. Izumi M., Yokoi M., Nishikawa N.S., Miyazawa H., Sugino A., Yamagishi M., Yamaguchi M., Matsukage A., Yatagai F., Hanaoka F. (2000). Transcription of the catalytic 180-kDa subunit gene of mouse DNA polymerase alpha is controlled by E2F, an Ets-related transcription factor, and Sp1. *Biochim Biophys Acta* **24**, 341-52.
19. Hunter, T. (1993). Braking the cycle. *Cell* **75**, 839-841.
20. Hunter, T., Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-582.
21. Hall M., Bates S., Peters G. (1995). Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* **11**, 1581-8.
22. Chou F.P., Tseng T.H., Chen J.H., Wang H.C., Wang C.J. (2002). Induced proliferation of human MRC-5 cells by nitrogen oxides via direct and indirect activation of MEKK1, JNK, and p38 signals. *Toxicol Appl Pharmacol* **181**, 203-8.
23. Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implication. *Environ. Health Prospect* **64**, 111-126.
24. Last, J.A., Sun, W.M., and Witschi, H. (1994). Ozone, NO and NOx oxidant air pollutants and more. *Environ. Health Prospect* **102**, 179-184.
25. Mohsenin, V. (1994). Human exposure to oxides of nitrogen at ambient and supra-ambient concentration. *Toxicology* **89**, 301-312.
26. Baumgartner K.B., Samet J.M., Stidley C.A., Colby T.V., Waldron J.A. (1997). Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 242-8.
27. Tanaka, S., Choe, N., Hemenway, D.R., Zhu, S., Matalon, S., and Kagan, E. (1998). Asbestos inhalation induces reactive nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J. Clin. Invest.* **102**, 445-454.
28. Gansauge S., Gansauge F., Nussler A.K., Rau B., Poch B., Schoenberg M.H., Beger H.G. (1997). Exogenous, but not endogenous, nitric oxide increases proliferation rates in senescent human fibroblasts. *FEBS Lett* **410**, 160-164.

Fig. 1 Effect of gaseous NOx on the cell viability and the cell cycle progression of MRC-5 cells.

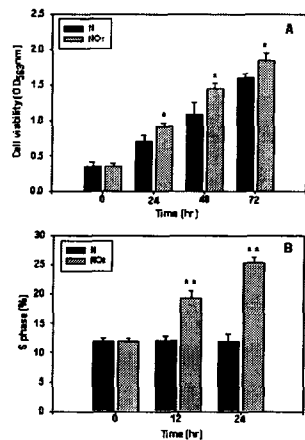


Fig. 2 Time course of gaseous NOx treatment on the protein expression of cyclins (A) and cdks (B) in MRC-5 cells.

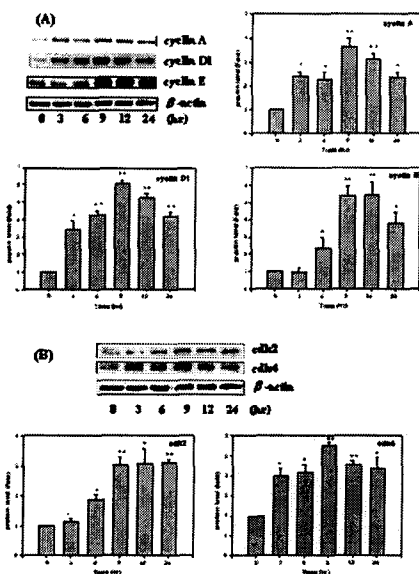


Fig. 3 Analysis of cyclin-ckd complexes in MRC-5 fibroblasts following gaseous NOx treatment.

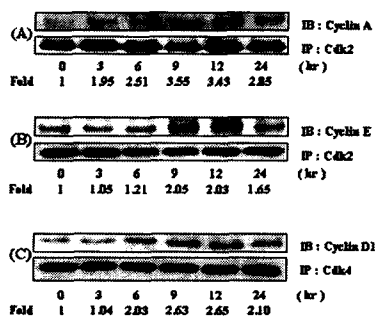


Fig. 4 Expression of cell cycle inhibitors in MRC-5 fibroblasts following gaseous NOx treatment.

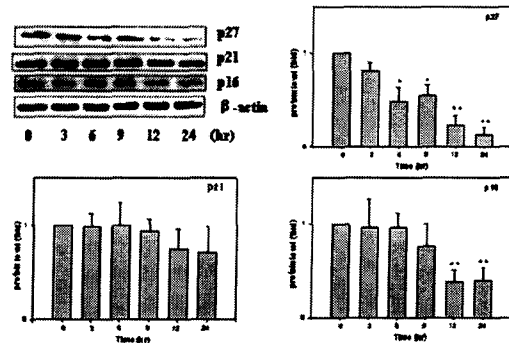


Fig. 5 Expression of Rb and Rb phosphorylation in MRC-5 fibroblasts following gaseous NOx treatment.

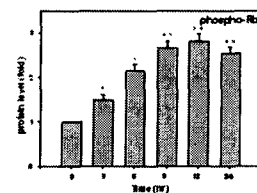
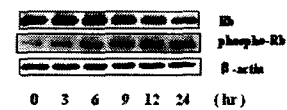


Fig. 6 Analysis of Rb-E2F complexes in MRC-5 fibroblasts following gaseous NOx treatment.

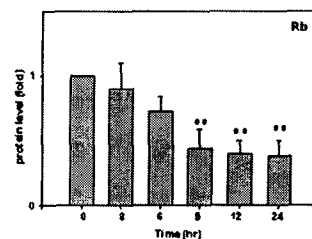


Fig. 7 Possible mechanisms of gaseous nitrogen oxides (NOx) mediated human lung fibroblast cells proliferation.

