

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
過氧化乙醯基硝酸(PANs)引發細胞凋亡機制之研討與癌症標記
ODC 在臺灣癌症之應用

**Study the mechanism of apoptosis induced by peroxyacetyl nitrate
(PANs) and the application of tumor marker ornithine
decarboxylase (ODC) in Taiwan**

計畫編號：NSC 89-2320-B-040-074

執行期限：89年11月01日至90年07月31日

主持人：劉光耀

執行機構及單位名稱：中山醫學院免疫學研究所

一、中文摘要

過氧化乙醯基硝酸(PANs)引發細胞凋亡之機制經由 ROS 及 RNS 釋放，經由自由基攻擊細胞內大分子包括蛋白質及 DNA，因此分析細胞內自由基及細胞傷害以有詳細之建立並已發表(1,2)；另癌症標記 ODC 及 antizyme 在喉癌(Hep 2 cells)及子宮頸癌(Hela cells)中篩選出，目前將純化蛋白質及生產抗體並以 Western blotting 及酵素活性進行研究臺灣地區 ODC 在癌症患者身上之表現，以確定 ODC 具癌症 marker 之代表。

關鍵詞：過氧化乙醯基硝酸、細胞凋亡、鳥胺酸去羧酵素

Abstract

Peroxyacyl nitrates induce apoptosis through releasing reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). The free radicals would be attracted with cellular macro-moleculars such as proteins and DNA (that including tyrosine, tryptophan and nucleotides). On the other hand, we have cloned the ODC and antizyme from the total RNA of Hep 2 cells and Hela cells. We will produce the pure ODC protein and the anti-ODC mono-clone antibody. The rule of ODC to be a tumor marker would be strong suggested to detect in Taiwan. This article provides new mechanism of air pollution and

potentially to find a new tumor marker.

Keywords: PANs, Apoptosis, ODC

二、緣由與目的

本實驗的主要目的是因國人罹患癌症比率升高，根據行政院衛生署統計，其中男性及女性罹患率皆高的則是肺癌。罹患癌症原因除了飲食中致癌物質、病毒感染以及放射線照射外，環境污染也是一大主因。為此，我們希望能從基礎之研究，空氣污染物PANs之致毒作用原理之探究，以預知可能造成肺癌之成因。這些相關之研究，在國外已有部份發展，但在國內尚未有具體的整治研究。我們期望藉此研究，闡明PANs之作用機理。另在臺灣包含肺癌、乳癌、子宮頸癌等癌症中尋找有效癌症標記(marker)如ODC及antizyme，並以融合瘤製造有效高力價之單株抗體是本實驗計劃的目標。

三、結果與討論

過氧化乙醯基硝酸是一個在受污染的空氣和香菸中相當常見的氣體，含氮空氣污染物過氧化乙醯基硝酸(peroxyacyl nitrates: PANs; $RC(O)OONO_2$)包含過氧化乙醯基硝酸(peroxyacetyl nitrate: PAN)、過氧化丙醯基硝酸(peroxypropionyl nitrate: PPN)、過氧化丁醯基硝酸(peroxybutyryl: PBN)、過

氧化苯醯基硝酸(peroxybenzoyl nitrate: PBzN)及過氧化鹵乙醯基硝酸(chloroperoxyacetyl nitrate: CPAN)等污染物。NO_x是氮氧化物之污染物(pollutants)，而NO_x又是光化學反應重要起始反應物，其中空氣中碳氫化合物，如各種醛基(acetylaldehyde, propionaldehyde, and butyraldehyde etc.)與氫氧自由基(-OH)作用後再與NO₂形成peroxyacyl nitrates(PANs)，PANs是由NO₂經光化學反應形成的二次污染物，對人體及植物均有毒性，且對人類的眼睛有刺激性。為研究PANs之基因毒性，以化學方法合成、分離及純化大量之標準物以用於進一步之研究。

NO可與超氧自由基(O₂⁻)迅速反應形成過氧亞硝酸根(Peroxynitrite, ONOO⁻)，當NO及O₂⁻在體內同時被刺激產生時，會產生大量且高毒性的ONOO⁻，且進一步降解成氫氧自由基(·OH)及二氧化氮(NO₂)，此兩種降解產物均為強氧化劑及具明顯細胞毒性。過氧亞硝酸根經由產生ROS引發細胞凋亡(Lin et al., 1995; 1997)。也可將酪胺酸(tyrosine)硝化成3-硝基酪胺酸(3-nitrotyrosine)。研究可利用HL 60 cells中3-nitrotyrosine的含量作為體內曝露於NO/NO_x的生物指標之一(Ischiropoulos et al., 1992; Yi et al., 1997, Ramezani et al., 1996)。而外來的空氣污染物甚而香煙中成份過氧化乙醯基硝酸(peroxyacetyl nitrate, PAN)對這些生物指標的影響程度如何將是本實驗中探討的主軸之一。

含氮氧化合物又總稱為活性氮物種(Reaction Nitrogen Species: RNS)，包含氮氧化物(NO_x)，PANs, peroxyntirite等，其對國人健康之影響並不清楚，本研究既是利用環境毒理學方法闡明空氣污染物：光化學反應二次污染物PANs以及強氧化劑過氧亞硝酸根(Peroxynitrite, ONOO⁻)對免疫細胞的毒性傷害及造成細胞死亡的機制探討，此外建立偵測空氣污染之生物

指標，以助於未來改善環境污染研究之依據。過氧化乙醯基硝酸已證實是個很強的催淚性氣體和光化學毒性物。它也被認為是自由基的釋放者且造成細胞凋亡之毒物。

根據先前在生化方面的研究發現，過氧化乙醯基硝酸會對酵素的Tyrosine、Tryptophan及dG作用，而我們對過氧化乙醯基硝酸的毒性作用方式可能有：一、過氧化乙醯基硝酸的氧化作用方式可能與過氧化氫或過氧化亞硝酸相似；二、過氧化乙醯基硝酸的硝化反應(nitration)和氫氧基化反應(hydroxylation)可能與過氧化亞硝酸相似；三、過氧化乙醯基硝酸的乙醯化反應可能與anhydride作用相似。

當細胞中酪氨酸(tyrosine)與過氧化乙醯基硝酸作用後，其產物經逆相高壓液相層析(RP-HPLC)鑑定後，分別為3-硝基酪氨酸(3-nitro-tyrosine)與3,5-雙硝基酪氨酸(3,5-dinitro-tyrosine)。其中，3-硝基酪氨酸被認為的過氧化亞硝酸出現指標，因此我們認為過氧化乙醯基硝酸可能在降解的過程中有過氧化亞硝酸的形成。之後我們比較過氧化乙醯基硝酸和過氧化亞硝酸對3-硝基酪氨酸的硝化反應，發現過氧化乙醯基硝酸能將其再硝化成3,5-雙硝基酪氨酸(3,5-dinitro-tyrosine)，而過氧化亞硝酸卻無法硝化酪氨酸成3,5-雙硝基酪氨酸，從過氧化乙醯基硝酸之半衰期數據顯示，過氧化乙醯基硝酸在生理條件下，其半衰期較過氧化亞硝酸高出許多，這也許可以解釋當以牛血清白蛋白或聚酪氨酸與過氧化乙醯基硝酸反應時可得到3,5-雙硝基酪氨酸，因為過氧化亞硝酸可能在還沒來得及再硝化3-硝基酪氨酸成3,5-雙硝基酪氨酸就已被分解；同時細胞時實驗得知，不同過氧化乙醯基硝酸的濃度硝基化位置與能力不同，較高濃度時(100 μM)，只發現過氧化乙醯基硝酸硝化酪氨酸成3,5-雙硝基酪氨酸；較低濃度時(50 μM)，則可發現過氧化乙醯基硝酸硝化酪氨酸成3-硝基酪氨酸及3,5-雙硝基酪氨酸。因此過氧化乙醯基硝酸是否具備另一種機制需進一步研究。

過氧化乙醯基硝酸對許多蛋白和酵素中之氨基酸殘基如:酪氨酸具有氧化或修飾之作用,因此也推測過氧化乙醯基硝酸對細胞的毒性可能是經由抑制細胞內重要酵素如:酪氨酸激酶(tyrosine kinases)等訊號傳遞路徑中重要酵素之作用,進而導致細胞生長的停止、阻礙細胞分化、抑制細胞增生、甚至導致細胞凋亡等現象。另外 PAN 在空氣中的含量(10 nM-800 nM)未高達如實驗中使用的濃度(10 μ M~100 μ M),但如果長期暴露於受污染的空氣中,肺會不斷的吸收,其造成之傷害可由本實驗結果得知可能之毒性機制。

本人發現空氣污染物 peroxyacetyl nitrate(PAN)引發免疫細胞細胞凋亡,包括人類前骨髓白血球癌母細胞(human promyelocytic leukemia HL 60 cell)、人類慢性骨髓白血球癌細胞(human chronic myelogenous leukemia K 562 cell)及老鼠單核白血球-巨嗜白血球細胞(mouse monocyte-macrophage RAW 264.7 cell),而其機制是經由 PAN 裂解產生之活性氧(reactive oxygen species)及活性氮(reactive nitrogen species)等活性物質。其中活性氧部份涉及超氧自由基(superoxide)、過氧化氫(H_2O_2)、氫氧自由基($\cdot OH$)的產生;而活性氮部份藉由類似過氧亞硝酸根(Peroxynitrite, $ONOO^-$)路徑引發細胞凋亡。實驗中 50 μ M PAN 引發 52.5%細胞凋亡,當加入各種不同自由基的清除劑,我們發現主要引發細胞凋亡是經由氫氧自由基及過氧化氫產生之路徑(34%),其次是超氧自由基的產生(12%),另外活性氮的產生將細胞內酪氨酸(tyrosine)硝化成 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine)及 3,5-雙硝基酪氨酸(3,5-dinitrotyrosine),進而抑制酪氨酸磷酸化(tyrosine phosphorylation),細胞中訊息傳遞因而被抑制,此亦可能造成細胞凋亡(12%)。

ODC 為製造多氨類(Polyamines)生合成的速率決定步驟的酵素(rate-limiting enzyme),其多氨類包括了腐氨(Putrescine),亞精氨(spermidine)和精氨

(spermine),多氨類主要功能是幫助 DNA 複製,在細胞週期(cell cycle)中可幫助細胞經過 S phase。因癌細胞生長快速,細胞內 ODC 活性較正常細胞高出許多,因此 ODC 被認為癌細胞的標記;但 ODC 半生期只有 20 分鐘,主因 ODC 受另一蛋白 Antizyme 調控。本實驗的主要目的是在臺灣包含肺癌、乳癌、子宮頸癌等癌症中尋找癌症標記 ODC,目前在喉癌(Hep 2 cells)及子宮頸癌(Hela cells)中篩選出,並已純化蛋白質及生產抗體並以 Western blotting 及酵素活性進行研究臺灣地區 ODC 在癌症患者身上之表現,以確定 ODC 具癌症 marker 之代表。

四、計畫成果自評

本年期計畫報告,除(一)、已發表於文獻(2);並且(二)、已完成 ODC 之確認(乳癌:73%;大腸癌:80%過度表現)。

五、參考文獻

1. Liu, G-Y., Chen, K-J., Lin-Shiau, S-Y. and Lin, J-K. Peroxyacetyl nitrate-induced apoptosis through generation of reactive oxygen species in HL 60 cells. *Mol. Carcinogen.* 25: 196-206, 1999. (SCI)
2. Lin, J-K., Chen, K-J., Liu, G-Y., Chu, Y-R. and Lin-Shiau, S-Y. Nitration and hydroxylation of cellular aromatic amino acids and guanine by the air pollutant peroxyacetyl nitrate. *Chem-Biol. Interact.* 127: 219-236, 2000. (SCI)