



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2320-B-040-010

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

主持人：林嬪嬪

協同主持人：陳凌雲

執行機構及單位名稱：中山醫學院毒理學研究所

## 一、中文摘要

已知多環芳香烴類化合物【包括 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) 與 benzo[a]pyrene(B[a]P)等】可經由活化 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 與 Aryl hydrocarbon-receptor nuclear translocator (Arnt)，誘導許多代謝酵素基因表現，包括 cytochrome P450 IA1(CYP1A1)、cytochrome P450 IB1(CYP1B1)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutathione-S-transferases (GST) 及 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 基因。近年來也有研究報導指出，AhR 與 Arnt mRNA 表現量會隨著皮膚表皮層分化而增加，而且皮膚癌組織之 AhR 功能減弱。本研究之目的為探討 AhR 及 Arnt 蛋白表現與皮膚角質細胞分化及癌化之相關性。

本研究發現 1. 正常皮膚角質細胞及基底細胞癌細胞均有 AhR 與 Arnt 蛋白表現。2. 在皮膚細胞中，AhR 表現與早期分化指標 K1、K10 同時表現，而 AhR 表現隨晚期分化指標 involucrin 表現增加而增加。3. 在皮膚組織中也顯示 AhR 與 Arnt 表現量隨著細胞分化程度越高而增加。4. 毛囊底部周圍組織表現大量 AhR 與 Arnt。因此分化程度較高及毛囊周圍之皮膚角質細胞 AhR 與 Arnt 表現較高，代謝能力可能較高。基底細胞癌細胞雖然不具有晚期分化指標 involucrin，但仍表現 AhR 與 Arnt 蛋白，因此應該具有代謝多環芳香烴類化合物之能力。

**關鍵詞：**皮膚角質細胞，多環芳香烴受器、細胞分化

## Abstract

It has been shown that polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) induce gene expression of cytochrome

P450IA1(CYP1A1), cytochrome P450 IB1(CYP1B1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione-S-transferases (GST) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) through activation of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). The mRNA level of AhR and Arnt were increased during keratinocyte differentiation. Previous studies demonstrated that CYP1A1 induction was suppressed in chemically-induced mouse skin papillomas and squamous cell carcinomas. The objective of this study is to investigate the relationship between expression level of AhR and Arnt with differentiaton and carcinogenesis.

We found that 1. both normal keratinocytes and basal cell carcinoma cells expressed AhR and Arnt proteins; 2. AhR protein expression coincided with early differentiation markers, K1 and K10; 3. AhR protein expression increased when late differentiation markers, involucrin, increased. In normal skin tissues, AhR and Arnt protein expression increased in late differentiated granular layers and keratinocytes around hair follicle. In conclusion, AhR and Arnt expression occur in early differentiated keratinocytes and increased in late differentiation keratinocytes. Although basal cell carcinoma cells failed to express late differentiation markers, they expressed AhR, Arnt, and early differentiation markers.

**Keywords:** keratinocytes, aryl hydrocarbon receptor (AhR), AhR nuclear translocator, differentiaton

## 二、緣由與目的

多環芳香烴類化合物 (PAHs) 廣泛存在於環境中，為一種很強的致癌物，會誘導皮膚細胞癌化。PAHs 可經由活化

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)與 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), 誘導許多代謝酵素基因表現, 包括 cytochrome P450 IA1 (CYP1A1)、cytochrome P450 IB1 (CYP1B1)、NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutathione-S-transferases (GST) 及 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 等基因, 增加其酵素活性。這些酵素活性的改變會直接影響細胞代謝活化或解毒的能力。近年來也有文獻指出, AhR 和 Arnt 與細胞分化及癌化有關。當利用原位雜交法檢測 AhR 與 Arnt mRNA 在人類表皮層中表現的位置時發現, 隨著表皮層中角質細胞分化程度愈高, AhR 與 Arnt mRNA 表現量愈多; 而在完全不分化的基底表皮細胞中, 無法偵測到 AhR 與 Arnt 的 mRNA (Wanner et al, 1996)。另外在小鼠皮膚癌組織中, CYP1A1 基因的表現被多環芳香烴類化合物 (PAHs) 誘導的程度比其周邊正常組織為低(Reiner Jr. et al, 1998), 表示皮膚組織在癌化後會抑制 PAHs 誘導基因表現的作用, 但是其機轉仍不清楚。因此 AhR 與 Arnt 的功能或表現可能會因細胞癌化而改變, 進而影響 PAHs 誘導基因表現的作用。我們利用兩株人類皮膚角質細胞, 一為人類皮膚基底層癌細胞株 (human basal cell carcinoma keratinocytes, BCC); 另一個為人類皮膚表皮細胞株 (human spontaneously immortalized non-tumorigenic keratinocytes, HaCaT), 比較癌化的皮膚細胞 (BCC) 與非癌化正常皮膚細胞 (HaCaT) 之分化程度與 AhR 蛋白表現之相關性。最後以組織免疫染色法檢測 AhR 蛋白在人類正常皮膚及皮膚基底細胞癌組織中之表現情形。

### 三、結果與討論

#### 一、BCC 和 HaCaT 細胞株, 細胞型態及分化程度之比較

首先我們比較 BCC 與 HaCaT 細胞的型態及分化程度。人類皮膚基底層癌細胞株 (human basal cell carcinoma, BCC) 與人

類皮膚表皮細胞株 (human immortalized non-tumorigenic keratinocytes, HaCaT) 分盤後培養第三天以及第十天, 我們利用負像倒立顯微鏡 (OLYMPUS-CK40) 觀察這兩株細胞外在的型態 (125 倍放大), 並利用照相機 (OLYMPUS-SC35), 將 125 倍放大之細胞型態影像攝入彩色底片 (柯達 VX200) 中。人類皮膚基底層癌細胞株 (BCC) 細胞型態較小, 且呈現角狀; 而人類皮膚表皮細胞株 (HaCaT) 細胞型態較大, 呈不規則狀, 且向外伸張。BCC 細胞株之上層細胞大多呈圓球狀, 並無層層疊疊的現象; 而 HaCaT 細胞株之上層細胞不但可以貼附, 還有層層疊疊的現象, 並在某一個區域形成類似圓丘的形狀。已知分化後之皮膚角質細胞能分層疊在基底細胞的上層 (Roop et al., 1987), 因此, 由兩株細胞外在的型態來看, HaCaT 細胞株之細胞分化程度似乎較 BCC 細胞株來的高。

Paramio 等人 (1998) 指出, 人類皮膚表皮細胞株 (HaCaT) 連續 0-20 天的細胞培養後, 細胞會持續分化, 在某一個區域形成類似圓丘的形狀。人類皮膚主要分為真皮層及表皮層, 而表皮層又因分化程度不同, 分為基底層、棘狀層、粒狀層及角質層, 並可進一步利用早期分化指標 (K1) 及晚期分化指標 (involucrin) 的表現, 來判定細胞分化之程度 (越上層的, 細胞分化程度越高) (Fuchs, 1990)。另外, Ayoub and Shklar 在 1963 年的報告中指出, 可以利用 Trichrome-staining procedure 的方式, 依細胞分化程度不同, 其細胞膜通透性不同的原理, 對細胞進行染色, 藉以判定細胞分化程度。因此, 我們進一步利用 Papanicolaou's stain 和分化早期指標 (K1-K10) 以及分化晚期指標 (involucrin) 蛋白的表現, 來探討這兩株細胞分化程度是否有差異。在 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株培養 3 天或 10 天後, 以 Papanicolaou's stain 及西方墨點法檢測 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株中細胞染色的情形以及 K1-K10 和 involucrin 蛋白的表現, 以判定這兩株細胞分化的程度。BCC 和 HaCaT 細胞株培養 3 天後, 皆可由分子

量較大的染劑---EA-50 所染色，而呈現藍綠色，在 HaCaT 細胞株中有少許細胞可由分子量較小的染劑---OG-6 所染色，而呈現橘黃色；經過 10 天培養後，BCC 細胞株皆被 EA-50 所染，而呈現藍色，而 HaCaT 細胞株中形成圓丘的部分，很明顯呈現橘黃色。BCC 和 HaCaT 細胞株皆表現早期分化指標 (K1-K10) 蛋白，但 BCC 細胞株並沒有晚期分化指標 (involucrin) 蛋白的表現；involucrin 蛋白在 HaCaT 細胞株中的表現程度，會隨著培養天數而增加。以上的結果表示，HaCaT 細胞株隨著培養時間越久，分化程度越高。而 BCC 細胞株分化程度比 HaCaT 細胞株低。因此 BCC 細胞株與 HaCaT 細胞株除了細胞型態不同外，這兩株細胞分化程度亦有所不同。

McCance 等人在 1988 年的報告中指出，人類皮膚鱗狀上皮癌中，細胞進行分化作用的能力較低，但可以檢測到有早期分化指標(K1-K10)的表現。而 Paramio 等人在 1998 年的報告中指出，人類皮膚表皮細胞株(HaCaT)在培養 0-20 天期間，細胞會持續分化，早期分化指標(K10)及晚期分化指標(involucrin)會隨細胞培養天數增加，而持續表現，但是表現的程度並不盡相同，以 involucrin 的表現較強。另外，Gaido 等人在 1994 年的報告中指出，可藉由 Trichrome-staining procedure 的方式，對人類皮膚表皮細胞進行染色，並判定其分化程度。由以上的文獻可以支持本實驗的結果：這兩株皮膚細胞分化程度不同，BCC 屬於癌化的皮膚基底層的細胞，細胞分化程度較低，失去分化的能力，而 HaCaT 雖然是 immortalized 細胞，但仍具有正常細胞分化的能力。

## 二、比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 基因及蛋白表現之程度

已知 AhR 與 Arnt 基因表現程度因皮膚細胞分化程度不同而異(Wanner et. al., 1995)，因此我們進一步比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中，AhR 與 Arnt 基因表現程度是否不同。以半定量 RT-PCR 方式測定 AhR 與 Arnt 基因的表現，結果發現，BCC 和 HaCaT 細胞株皆有 AhR 與 Arnt 基因表現，且表現

程度相似。我們進一步檢測 AhR 與 Arnt 蛋白的表現。在經過細胞培養 3 天或 7 天後，利用西方墨點法來檢測 BCC 和 HaCaT 細胞株之細胞質與細胞核中 AhR 與 Arnt 蛋白的表現(AhR 與 Arnt 的分子量分別為 105 KDa 和 85 KDa)。結果發現，經過細胞培養 3 天後，在細胞質的部分：AhR 蛋白在這兩株細胞中皆有表現，而 Arnt 蛋白只在 BCC 細胞株之細胞質中有表現；在細胞核的部分：這兩株細胞中皆有 AhR 與 Arnt 蛋白的表現；經過細胞培養 7 天後，HaCaT 細胞的分化程度增加，在細胞質的部分：HaCaT 細胞的 AhR 與 Arnt 蛋白的表現量也有明顯的增加，但 BCC 細胞並不表現分化指標 involucrin，且 AhR 與 Arnt 蛋白也沒有明顯的增加；在細胞核的部分：這兩株細胞皆有 AhR 與 Arnt 蛋白的表現，且表現量並沒有明顯的增加；而  $\beta$ -Actin 蛋白在這兩株細胞中的表現量並沒有太大的差異。由此可知，AhR 與 Arnt 蛋白表現隨著皮膚細胞分化程度增加而增加。

## 三、比較正常皮膚及皮膚基底細胞癌中 AhR 與 Arnt 蛋白表現之情形

最後我們以組織免疫染色法偵測正常皮膚及皮膚基底細胞癌中 AhR 與 Arnt 蛋白表現之情形，我們發現正常皮膚上皮組織中 AhR 及 Arnt 主要存在於角質細胞中，AhR 主要位於細胞質，而 Arnt 位於細胞質及細胞核。而且隨著角質細胞分化程度越高，AhR 與 Arnt 蛋白表現越多，正常基底細胞不具有 AhR 或 Arnt。正常毛囊組織底部周圍之角質細胞表現大量 AhR 與 Arnt 蛋白。皮膚基底細胞癌細胞中 AhR 與 Arnt 均主要表現於細胞質。

綜合本研究結果，得到以下結論：1. 正常皮膚角質細胞及基底細胞癌細胞均有 AhR 與 Arnt 蛋白表現。2. 在皮膚細胞中，AhR 表現與早期分化指標 K1、K10 同時表現，而 AhR 表現隨晚期分化指標 involucrin 表現增加而增加。3. 在皮膚組織中也顯示 AhR 與 Arnt 表現量隨著細胞分化程度越高而增加。4. 毛囊底部周圍組織表現大量 AhR 與 Arnt。因此分化程度較高及毛囊周圍之皮膚角質細胞 AhR 與 Arnt 表現較

高，代謝能力可能較高。基底細胞癌細胞雖然不具有晚期分化指標 involucrin，但仍表現 AhR 與 Arnt 蛋白。

#### 四、計畫成果自評

本計畫完成 70%既定目標，尤其於計畫執行中，得到人類皮膚組織切片，得以進行組織免疫染色，了解 Ahr 與 Arnt 於組織中之分布情形，對於將來皮膚代謝能力之研究有莫大之幫助。

#### 五、參考文獻

Ayoub, P. and Shklar, G. (1963). A modification of the mallory connective tissue stain as a stain for keratin. *J. Oral. Surg.* 16, 580-581.

Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation : The Bare Essentials. *J. Cell Biol.* 111, 2807-2814.

Paramio, J. M., Lain, S., Segrelles, C., Lane, E. B. and Joreano, J. L. (1998) Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 17, 949-957.

Reiners, Jr. J. J., Jones, C. L., Hong, N. and Myrand, S. P. (1998) Differential induction of *cypl1a*, *cypl1b1*, *ahd4*, and *nmol* in murine skin tumors and adjacent normal epidermis by ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Carcinogen.* 21, 135-146.

Wanner, R., Brommer, S., Czarnetzki, B. M. and Rosenbach, T. (1995) The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 706-711.

Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. M. and Rosenbach, T. (1996) Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317(2), 105-111.