

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以定量 PCR 對 UV、BPDE 造成之 DNA 傷害，在 *p53* 基因之傷害敏感性及修補特異性研究

Kinetics of damage formation and repair in *p53* gene using a quantitative PCR analysis.

計畫編號：NSC 88-2314-B-040-024

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：王憶卿 執行機構：私立中山醫學院 毒理所

一、中文摘要

核酸修補 (nucleotide excision repair) 是細胞中最常使用的 DNA 傷害修補機制。本研究室將一定量聚合酵素反應 (Quantitative polymerase chain reaction, QPCR) 改進後，成功的應用在專一基因之核酸修補研究。這些改進包括增加反應模板的長度至 7 kb、在反應中加入放射線標記之核酸，有效的增加了定量聚合酵素反應之敏感性，使其能以少量的 DNA 偵測較低劑量的 DNA 傷害，並且在反應中加入一增量小片段序列的引子 (primer) 與標的基因 (target gene) 引子同時反應，因為此小片段 DNA 在極高的劑量處理下，亦不易產生 DNA 傷害，可以反映每個反應之起始 DNA 模板濃度的高低，並且以同時反應 (co-amplification) 的方式，更可以控制實驗中無可避免的取樣誤差。本計畫的研究目標為了解各種癌細胞與正常細胞對於 UV 及 BPDE 所造的傷害敏感性與傷害修補效率是否有所差異；並調查修補效率是否與每個基因之轉錄效率相關。本計畫分析 BES6 正常肺細胞與 CL3 肺癌細胞以 20 J/m² 之紫外線處理後，於 0, 6, 12, 24 hrs 萃取其 DNA，以 QPCR 分析其 *p53* 基因之傷害敏感性與修補效率，結果顯示 BES6 正常肺細胞以 20 J/m² 之紫外線處理後 6hr 其 *p53* 基因修補效率可達 63%，而 CL3 肺癌細胞之修補效率只有 42%。CL3 肺癌細胞與 A427 肺癌細胞以 0.5 μ g/ml 之 BPDE 處理後，於 0, 3, 6, 9 hrs

萃取其 DNA，以 QPCR 分析其 *p53* 基因之傷害敏感性與修補效率。顯示在起始 DNA 傷害數目方面，CL3 肺癌細胞較 A427 細胞為敏感；在修補效率方面，CL3 肺癌細胞亦較 A427 細胞為差，所以各種肺癌細胞對 BPDE 傷害之修補效率在基因層次上是有所差異的。這些結果將有助於了解一些致癌與抑癌基因之 DNA 傷害敏感性與傷害修補效率的差異，並對核酸修補機制與癌症形成的關係有進一步的了解。

關鍵詞：肺癌、修補基因、*p53* 基因、PCR

二、緣由與目的

一些物理化學物質造成的傷害在形成量與修補效率上皆有一異質性 (heterogeneity) 的現象，也就是說一些轉錄活性較高的基因之 DNA 傷害其修補效率較其他區域為快 (1, 2)。實驗證明基因上的 DNA 傷害之修補效率與該基因之轉錄速率有一正比關係 (3)，亦有研究說明 DNA 傷害的形成與其修補在正染色質 (euchromatin) 與異染色質 (heterochromatin) 是不相同的，異染色質雖然其 DNA 傷害的形成量較少，但其修補效率卻比正染色質來的慢 (4)，例如，紫外線所造成之 DNA 傷害分佈，會受到 DNA 上的結合蛋白影響，有蛋白的區域，紫外線傷害則較少 (5)；一些化學物質所造成之 DNA 傷害在 nucleosome 之間的 linker 區域與 DNase 敏感區域分佈較多 (1)。因此 DNA 傷害

的形成量與其修補效率在每個基因是不同的，但是基因成次上的傷害敏感性與修補效率與癌症形成的相關性，因為缺乏一敏感與可靠的實驗方法，還未有直接證據來支持。

1985年由Hanawalt等學者所發展出來的南方雜交分析法(Southern hybridization-based assay)的確提供了在基因層面上測量傷害形成量與修補效率的可靠方法(6, 7)，但因此方法需要大量的DNA、特別的限制酵素、及具有認知DNA傷害的專一酵素，所以並不能廣泛的利用於每一個基因或實驗室。最近，定量聚合酵素連鎖反應(quantitative polymerase chain reaction, QPCR)已被發展出來(8-13)。這種分析方法的原理是利用若聚合酵素連鎖反應時模板含有DNA傷害，則會抑制Taq聚合酵素在連鎖反應的效率；將含有傷害及無傷害的模板反應效率加以比較，即可推算出此模板上DNA傷害的數量。但因最初的設計只應用在小片段DNA的分析，所以必須用較大的劑量才能偵測到DNA傷害及其修補，同時因為實驗組之間起始DNA模板數目不易控制成完全相同，所以實驗誤差大。本研究室為了克服這些問題，發展出一種“多重式長片段”定量聚合酵素連鎖反應(multiplex long QPCR)，分析較長的基因片段，以下降DNA傷害藥劑的處理劑量，並同時加入一合成小片段之primer進行分析，此小片段之DNA因在所使用的低劑量下並不會造成顯著之DNA傷害，所以其增量效率代表每個實驗組之起始DNA模板數目，以此“多重式長片段分析法”，即可提昇QPCR之敏感性及可靠性。

三、研究方法

細胞株。人類正常肺細胞株BES6、人類肺癌細胞株CL3(由一台灣腺肺癌患者所建立)、人類肺癌細胞株A427(由美國細胞培養公司購得)分別培養在含10%血清、L-glutamin、抗生素(Gibco)之RPMI-1640(PH 7.5)、F12(PH 7.4)、MEM

(PH 7.4)培養液中，培養於37℃，5% CO₂培養箱。

環境致癌物紫外線與BPDE的處理。在細胞株的處理方面，處理前一天將細胞以1 x 10⁶個培養於10公分培養皿，紫外線處理前以磷酸鹽緩衝液浸濕兩次，再以波長254nm之紫外光(Stratalinker 1800)照射所需劑量(10-50 J/m²)。若要分析該劑量造成的起始傷害量則將處理後的細胞之DNA馬上萃取出；若要分析細胞的修補效率，則將處理後的細胞以培養液繼續培養在37℃，5% CO₂培養箱直至所須之修補時間後再將其DNA萃取出。環境致癌物BPDE的處理，流程大致紫外線之處理，BPDE之劑量為0.1-0.5 μg/ml (ChemSyn Science Laboratories, NCI Chemical Carcinogen Repository)。

多重式長片段聚合酵素連鎖反應。高分子量基因體DNA依QIAamp DNA萃取組(Qiagen)原廠指示步驟來萃取。聚合酵素反應的總體積為40 μl，反應溶液包含50-400 ng之基因體DNA，二對primer引子(一對用於增量p53基因；一對用於增量IFN-1序列)，反應溶液中並加入重組Thermus brockianus聚合酵素(DyNazyme™) 2單位與其緩衝溶液。各種引子的序列如Table 2。反應之時間、溫度為：95℃、2分鐘；95℃、1分鐘，67℃、3分鐘，72℃、4分鐘，重覆16次；95℃、1分鐘，67℃、3分鐘，72℃、5分鐘，循環12次。之後PCR產物以8% polyacrylamide，0.5倍TBE溶液，電泳50V(5V/cm) 12至18小時，凝膠乾燥後壓片分析。

DNA傷害數目及修補效率之定量分析。含放射線之PCR產物經壓片轉漬至X光片後，其強度以定量分析儀Alpha Imager™ 2000測定分析，每組PCR反應之P53基因片段強度先以其模板濃度指標IFN-1序列之強度加以校正。處理後馬上萃取出之DNA可推算出該劑量再P53基因所造成之起始DNA傷害數目，處理後經不同時間修補再萃取出之DNA，先算出每一時間點在P53基因所含之DNA傷害數目，再將傷害數目與起始DNA傷害數目相比，

即可推算出每一個時間點之修補效率。

多重式反轉錄聚合酵素連鎖反應。 細胞株及血球細胞內含多重覆 A 核酸之 RNA 以 TRIZOL 溶液 (Gibco) 萃取出來, 互補核酸 (cDNA) 則以反轉錄酵素 SuperSCRIPT (Gibco)、2.5 μ g 純化之 RNA 反應作出。

修補基因包含 *XPCC*, *hMSH2*, *XRCCI*, *ERCCI* 的表現以多重式聚合酵素連鎖反應來分析, *S-actin* 基因也一併分析以作為 RNA 濃度的指標, 每一基因之引子序列如 Table 2。引子所使用的濃度為: *p53*, 4 μ M; *XPCC*, 37.5 μ M; *hMSH2*, 25 μ M; *XRCCI*, 2.5 μ M; *ERCCI*, 2.5 μ M; *S-actin*, 0.25 μ M。反應 95°C、5 分鐘; 95°C、1 分鐘, 58°C、1.75 分鐘, 72°C、1.75 分鐘, 以此循環 34 次。PCR 產物以 3% 洋菜膠電泳於 0.5 μ g/ml ethidium bromide 中。

mRNA 表現之分析。 PCR 產物經電泳以 ethidium bromide 呈色之後, 其強度以定量分析儀測定, 每組 PCR 反應之修補基因片段強度先以 RNA 濃度指標 *S-actin* 基因之強度加以校正, 每個細胞於該修補基因之 mRNA 表現差異性即可依校正後的強度比較出來。

統計分析。 每個細胞株對紫外線、BPDE 之傷害敏感性與修補效率經計算後, 每個實驗組重複三次後取其平均值及標準差, 細胞株及個體細胞之傷害敏感性與修補效率差異則以雙尾鑑定法 (two-tailed Student *t* test) 評估。每個細胞株其修補基因之 mRNA 表現量經計算後, 重複三次實驗取其平均值及標準差。

四、結果與討論

Multiplex long QPCR 分析法之最適宜條件。 因為定量 PCR 分析法必須要在 PCR 效率與起始 DNA 濃度和 PCR 循環數目呈線性增加的範圍內進行, 所以標的基因 *p53* 與 DNA 濃度指標 *IFN β* , 以 50-400 ng 之起始 DNA 濃度或 24-32 個 PCR 循環數目進行 multiplex long QPCR 分析, 將 PCR

產物電泳後以定量分析儀測定其強度。Fig. 1 與 Fig. 2 顯示當起始 DNA 濃度為 50-300 ng, PCR 循環數目為 24-28 時, *p53* 基因與 *IFN β* 序列之 PCR 效率為線性增加的範圍內, 因此在之後的 Multiplex long QPCR 皆以 200 ng 之 DNA 進行 28 個循環來分析。

BES6 正常肺細胞與 CL3 肺癌細胞其 *p53* 基因對紫外線傷害之修補效率。 為了解正常肺細胞與肺癌細胞對紫外線傷害之修補效率是否在基因層次上有所差異, BES6 正常肺細胞與 CL3 肺癌細胞以 20 J/m² 之紫外線處理後, 於 0, 6, 12, 24 hrs 萃取其 DNA, 以 multiplex long QPCR 分析其 *p53* 基因之傷害敏感性與修補效率, (0 hr 組與未處理組比較後可推算紫外線在 *p53* 基因之起始 DNA 傷害數目; 6, 12, 24 hrs 組所算出之 DNA 傷害數目與起始 DNA 傷害數目相比較後, 即可推算出細胞對紫外線傷害在 *p53* 基因之修補效率) Fig. 3 顯示 BES6 正常肺細胞以 20 J/m² 之紫外線處理後 6hr 其 *p53* 基因修補效率可達 63%, 而 CL3 肺癌細胞之修補效率只有 42%, 此差異性達到統計分析的顯著意義 ($P < 0.05$, by the *t* test), 所以正常肺細胞與肺癌細胞對紫外線傷害之修補效率在基因層次上是有所差異的。XP-A 細胞為 multiplex long QPCR 分析之控制組, 因為 XP-A 為已知修補能力缺乏之細胞, 的確 XP-A 細胞在紫外線處理後直至 24 hr 皆沒有顯示修補。

CL3 肺癌細胞與 A427 肺癌細胞其 *p53* 基因對 BPDE 傷害之修補效率。 為了解不同的肺癌細胞對 BPDE 傷害之修補效率是否在基因層次上有所差異, CL3 肺癌細胞與 A427 肺癌細胞以 0.5 μ g/ml 之 BPDE 處理後, 於 0, 3, 6, 9 hrs 萃取其 DNA, 以 multiplex QPCR 分析其 *p53* 基因之傷害敏感性與修補效率。Table 1 顯示以 0.5 μ g/ml 之 BPDE 處理後, 在起始 DNA 傷害數目方面 (0 hr), CL3 肺癌細胞較 A427 細胞為敏感 (CL3, 1.44 damages/fragment; A427, 0.799 damages /fragment); 在修補效率方面, CL3 肺癌細胞亦較 A427 細胞為差, (3hr 之修補效率: CL3, 20%; A427,

100%)，所以各種肺癌細胞對 BPDE 傷害之修補效率在基因層次上是有所差異的。

BES6 正常肺細胞與 CL3 肺癌細胞其 *p53* 基因及七種修補基因之 mRNA 表達之差異性。 為了了解正常肺細胞與肺癌細胞對紫外線傷害之修補效率是否是因其 *p53* 基因及修補基因之 mRNA 表達有所差異，本研究以反轉錄聚合酵素反應 (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR) 偵測 *p53* 基因 (Fig. 4) 及 XPC, hMSH2, XRCC1, ERCC1, (Fig. 5) ERCC2, ERCC3, ERCC6 (Fig. 6) 七種修補基因之 mRNA 表達。結果顯示 CL3 肺癌細胞之 *p53* 基因、XPC 基因、hMSH2 基因、XRCC1 基因、ERCC2 基因、ERCC3 基因顯著的低於 BES6 正常肺細胞 ($P < 0.05$)。

四、參考文獻

1. Carothers, A. M., Zhen, W., Mucha, J., Zhang, Y.-J., Santella, R. M., Grunberger, D., and Bohr, V. A. DNA strand-specific repair of (\pm)-3 α ,4 β -dihydroxy-1 α ,2 α -epoxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[c]phenanthrene adducts in the hamster dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, *89*: 11925-11929, 1992.
2. Chen, R.-H., Maher, V. M., Brouwer, J., van de Putte, P., and McCormock, J. J. Preferential repair and strand-specific repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the *HPRT* gene of diploid human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, *89*: 5413-5417, 1992.
3. Tang, M.-S., Bohr, V. A., Zhang, X.-S., Pierce, J., and Hanawalt, P. C. Quantitation of aminofluorene adduct formation and repair in defined DNA sequences in mammalian cells using UVRABC nuclease. *J. Biol. Chem.*, *264*: 14455-14462, 1989.
4. Snyderwine, E. G. and Bohr, V. A. Repair of 4NQO adducts in specific genes in mammalian cells. *Proc. Natl. Assoc. Cancer Res.*, *32*: 108. 1991.
5. Slijepcevic, P. and Natarajan, A. T. Distribution of X-ray induced G2 chromatid damage among Chinese hamster chromosomes: influence of chromatin structure. *Mutat. Res.*, *323*: 113-119, 1994.
6. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D., and Holmquist, G. P. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, *12*: 1798-1804, 1992.
7. Gao, S., Drouin, R., and Holmquist, G. P. DNA repair rates mapped along the human *PGK-1* gene at nucleotide resolution. *Science*, *263*: 1438-1440. 1994.
8. Tu, Y., Tornaletti, S., and Pfeifer, G. P. DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *EMBO J.*, *15*: 675-683, 1996.
9. Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays*, *18*: 221-228, 1996.
10. Nishigori, C., Wang, S., Miyakoshi, J., Sato, M., Tsukada T., Yagi, T., Imamura, S., and Takebe, H. Mutations in *ras* genes in cells cultured from mouse skin tumors induced by ultraviolet irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, *91*: 7189-7193, 1994.
11. Chakravarti, D., Pelling, J. C., Cavalieri, E. L., and Rogan, E. G. Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-*ras* mutations in mouse skin papillomas: The role of apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, *92*: 10422-10426, 1995.
12. Madhani, H. D., Bohr, V. A., and Hanawalt, P. C. Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes: *c-abl* and *c-mos*. *Cell*, *45*: 417-422, 1986.
13. Beecham, E. J., Mushinski, J. F., Shacter, E., Potter, M., and Bohr, V. A. DNA repair in the *c-myc* proto-oncogene locus: possible involvement in susceptibility of resistance to plasmacytoma induction in BALB/c mice. *Mol. Cell. Biol.*, *11*: 3095-3104, 1991.