

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 89-2311-B-040-003

執行期限：88年08月01日至89年07月31日

主持人：陳凌雲

協同主持人：林嬪嬪

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

多環芳香烴感受器 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是一個被 ligand 活化的轉錄因子，其 ligands 主要是多環芳香烴類環境污染物，譬如 Benzo[a]pyrene (B[a]P) 或 Dioxin，AhR 可調控很多與藥物代謝有關的基因。當細胞 (特別是皮膚細胞) 的生長環境中含有 B[a]P 或 Dioxin 時，AhR 會被活化進而將 cytochrome P450 (CYP1A1) 轉錄，活化的 CYP1A1 則可將毒物代謝活化。從老鼠實驗知以化學藥物處理，誘發皮膚腫瘤後，AhR 的功能會降低，因而造成 CYP1A1 的基因誘導降低。由此可知，AhR 所控制的基因表現與腫瘤形成有密切關係。最近，在我們研究室以 B[a]P 處理 skin basal cell carcinoma (BCC) 與非癌化 HaCaT 細胞，結果發現 CYP1A1 的基因誘導性在 BCC 細胞會降低，從 RT-PCR 知兩細胞株 AhR 的 mRNA 均無差異，但從 Western blot 知 AhR 蛋白在 BCC 細胞中明顯較低。本計劃深入探討在 BCC 癌細胞 AhR 蛋白量及功能降低的原因。我們發現 (1) AhR 蛋白表現程度與皮膚角質細胞分化程度有關，分化程度越高，AhR 表現越多；(2) AhR 蛋白結構不穩定，以超音波破碎細胞時，AhR 蛋白量減少；(3) genistein 及 herbimycin A 可增加 CYP1A1 被誘導之程度，因此 BCC 細胞株中可能存在某種 kinase 蛋白過度活化，而影響 B[a]P 誘導 CYP1A1 基因表現之過程。(4) B[a]P 處理 24 小時後 BCC 細胞質中 AhR 蛋白量減少，但細胞核中 AhR 蛋白不受影響，以上這些因素都可能造成 BCC 細胞對 B[a]P 沒有反應。

關鍵詞：多環芳香烴感受器、皮膚角質細胞、cytochrome P4501A1

Abstract

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated cytosolic transcription factor which regulates a number of genes encoding drug-metabolizing enzymes, such as cytochrome P4501A1 (CYP1A1). Polycyclic aromatic hydrocarbons, such as benzo[a]pyrene (B[a]P) and dioxin (TCDD), are AhR agonists. When keratinocytes, the major cell type in the epidermis of the skin, are exposed to TCDD, AhR is activated and increases CYP1A1 gene transcription. AhR agonists increase metabolic activation of various procarcinogens. It is recently reported that AhR function and CYP1A1 inducibility are downregulated in chemically induced skin tumors in mice. CYP1A1 mRNA level in the normal tissue adjacent to papillomas is increased after treatment with TCDD but no increase in the tumors. We have two human keratinocyte cell lines: a nontumorigenic HaCaT cells and a cell line derived from skin basal cell carcinoma (BCC). Our preliminary data show that CYP1A1 gene expression is induced by AhR agonist, B[a]P, in HaCaT cells, but not in BCC cells. Consistent with CYP1A1 inducibility, AhR protein level is much lower in BCC than in HaCaT cells. In this project we further investigate why BCC cells were non-responsive to B[a]P. We found that (1) BCC cells were less differentiated than HaCaT cells; (2) AhR protein was unstable and sensitive to ultrasonication; (3) Treatment with genistein and herbimycin A increased CYP1A1 inducibility in BCC cells. Therefore, certain protein kinases may overactivated in BCC cells, which interfere CYP1A1 inducibility; (4) Treatment with B[a]P decreased cytosolic AhR levels. Thus ligand (B[a]P) binding may enhance AhR protein degradation. All these factors may contribute to the non-responsiveness to

B[a]P in BCC cells.

Keywords: keratinocytes, aryl hydrocarbon receptor (AhR), cytochrome P4501A1

二、緣由與目的

已知多環芳香烴類化合物塗抹於動物皮膚上，會導致皮膚癌，TCDD 致癌機制並不清楚，但 B[a]P 的致癌機制則是經由 cytochrome P4501A1 等酵素代謝活化後直接攻擊 DNA 所致 (Ashurst et al., 1983)。多環芳香烴類化合物進入生物體後，可做為一種誘導因子，與細胞質的多環芳香烴感受器 (AhR) 結合，並將其活化 (Rowlands and Gustafsson 1997; Whitlock et al., 1996)。被活化之 AhR 與 Aryl hydrocarbon receptor translocator (Arnt) 結合成複合體後，轉移至細胞核內，鍵結到所調控基因上游的一個 *cis*-transacting DNA element 稱為 xenobiotic responsive element (XRE)，增強基因的轉錄 (Rowlands and Gustafsson 1997; Whitlock et al., 1996)。AhR-Arnt 調控的代謝酵素基因，包括 cytochrome P4501A1、cytochrome P4501B1、glutathione-s-transferase、aldehyde dehydrogenase、glucuronosyl transferase、NADPH quinone oxidoreductase 等，這些酵素均參與藥物、毒物的代謝活化與解毒反應 (Schrenk 1998)。

我們實驗室有兩個人類皮膚角質細胞株 HaCaT 與 BCC。HaCaT 細胞是從正常人類皮膚分離得到的角質細胞衍生而來，經自然轉移，是一無致癌性之細胞株。BCC 細胞則是從人類皮膚基底細胞癌組織分離得到的癌細胞株。當 BCC 與 HaCaT 細胞以多環芳香烴類化合物 B[a]P 處理 24 小時後，只有 HaCaT 細胞的 CYP1A1 基因表現與酵素活性被誘導，而 BCC 細胞沒有反應。

三、結果與討論

1. BCC 和 HaCaT 細胞株分化程度之比較

近年來也有文獻指出，AhR 和 Arnt 表現程度與細胞分化有關。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 (Wanner et al., 1996)。首先我們比較 BCC 與 HaCaT 細胞的分化程度。我們利用 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 細胞株的 AhR 蛋白表現量偏低可能與其分化程度有關。

二、比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 被活化之程度

我們已經初步證實，在 BCC 細胞中 CYP1A1 基因表現無法被誘導。為了更進一步確定 AhR 功能喪失，我們接著以 Gel retardation assay 比較 BCC 和 HaCaT 細胞株中 AhR 與 Arnt 被 B[a]P 活化之程度。結果發現 HaCaT 細胞株經 B[a]P 處理後，出現一明顯具有 ³²P 放射性之 DRE-蛋白質複合體。此複合體可被 100 倍濃度之非放射性 oligo(DRE) 競爭而消失，但並不會被 100 倍濃度之非放射性 oligo(突變型 DRE) 競爭而消失，顯示其為專一性之 DRE-蛋白質鍵結物應是

AhR-Arnt 與 DNA 之複合體。但是 BCC 細胞株中，在加入 B[a]P 之後，此複合體的強度並未增強，顯示 B[a]P 在 BCC 細胞株中無法增強 AhR/Arnt 與 DRE 之鍵結能力。本實驗進一步確認 BCC 細胞之 AhR 無法被 B[a]P 活化，進而調控 CYP1A1 基因表現。

三、探討 BCC 細胞 AhR 蛋白之穩定性

我們先前實驗以細胞超音波震盪器破碎 BCC 細胞，現在改以冷凍方式打破細胞，發現可增加細胞萃取液之 AhR 含量，因此推測 AhR 蛋白對熱敏感，接著我們以 gel filtration HPLC 分析細胞萃取液中 AhR 之分子量，發現 BCC 與 HaCaT 細胞的 AhR 一樣可與 heat shock protein 90 形成將近 200 KDa 之蛋白複合物。

四、探討 protein kinase 是否與 BCC 細胞的 AhR 不活化有關

前人研究顯示，由化學致癌物所誘導的小鼠皮膚癌組織中，Ha-ras 發生突變的機率高達 90 % (Mills, et. al., 1992; Quintanilla, et. al., 1986)。已知 ras 會活化細胞內許多種 kinases，因此，我們假設 BCC 細胞株中存在某種 kinase 蛋白且過度活化，以致影響 B[a]P 活化 AhR/Arnt 之作用。Genistein 是一種非專一性 tyrosine kinase 抑制劑 (Wei, et. al., 1995)；Herbimycin A 也是一種 tyrosine kinase 抑制劑，主要抑制 PP60^{c-src} kinase (Kim, et. al., 1995)。將 BCC 細胞株連續培養 2 天後，預先處理 tyrosine kinases 抑制劑 --- 50 μ M 及 100 μ M Genistein 與 1 μ g/ml 及 5 μ g/ml Herbimycin A 15 分鐘，再加入 10 μ M B[a]P 繼續培養 24 小時後，以半定量 RT-PCR 方式測定 CYP1A1 基因的表現。結果發現，預先處理 tyrosine kinases 抑制劑 (Genistein 與 Herbimycin A) 能增強 B[a]P 誘導 BCC 細胞株 CYP1A1 基因的表現 (與對照組比較分別增加 2.71 倍及 3.65 倍的表現量)，且呈劑量反應的關係，表示在 BCC 細胞株中可能有某種 kinase 蛋白過度活化，而影響 B[a]P 所誘導之 CYP1A1 基因表現。

五、探討 B[a]P 對 AhR 蛋白穩定性之影響

以 10 μ M B[a]P 處理 BCC 細胞 24 小時後，將細胞質與細胞核分離，以西方墨點法分析 AhR 蛋白量，發現經 B[a]P 處理後，細胞核之 AhR 量不變，但細胞質中 AhR 蛋白量減少，因此推測 B[a]P 鍵結 AhR 後，使 AhR 蛋白破壞，而降低 AhR 之功能。

六、計畫成果自評

本計畫完成 70% 既定目標，尤其發現 herbimycin A 的作用暗示 PP60^{c-src} 可能影響 AhR 訊息傳遞路徑，將來值得進一步探討。

五、參考文獻

- Ashurst, S.W., Cohen, G.M., Nesnow, S., DiGiovanni, J. and Slaga, T.J. (1983) Formation of benzo[a]pyrene/DNA adducts and their relationship to tumor initiation in mouse epidermis. *Cancer Res.* 43, 1024-1029.
- Kim, B. Y., Ahn, S. C., Oh, H. K., Lee, H. S., Mheen, T. I., Rho, H. M. and Ahn, J. S. (1995) Inhibition of PDGF-induced phospholipase D but not phospholipase C activation by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(3), 1061-1067.
- Mills, K. J., Bocckino, S. B., Burns, D. J., Lommis, C. R. and Smart, R. C. (1992) Alterations in protein kinase C isozymes α and β 2 in activated Ha-ras containing papillomas in the absence of an increase in diacylglycerol. *Carcinogen.* 13, 1113-1120.
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. and Balmain, A. (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322, 78-80.
- Rowlands, J.C. and Gustafsson, J.K. (1997)

Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 27, 109-134.

Schrenk, D. (1998) Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo-and xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1155-1162.

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.

Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. and Wang, Y. (1995) Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 208(1), 124-130.

Whitlock, Jr. J.P., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q. and Li, H. (1996) Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* 10, 809-818.