

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

分項計畫五：肺腺炎之環境因子及基因體毒理研究—油煙與
二手煙在基因表現、荷爾蒙及 AHR 與癌症之關係(子計畫二)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-3112-P-040-003-Y

執行期間：91年05月01日至91年12月31日

執行單位：中山醫學大學毒理學研究所

計畫主持人：林嬪嬪

計畫參與人員：盧慧詩 范嘉惠

報告類型：完整報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 14 日

計畫編號：NSC 91-3112-P-040-003

行政院衛生署九十一年度科技研究發展計畫

台灣肺癌基因體研究及臨床應用：著重於女性肺腺癌-
分項計畫五：肺腺癌之環境因子及基因體毒理研究- 油
煙與二手煙在基因表現、荷爾蒙及 AhR 與癌症之關係
(子計畫二)

研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：林嬪嬪

研究人員：范嘉惠、盧慧詩

執行期間：91年05月01日至91年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目錄

中文摘要	1
英文摘要	2
(1) 前言	3
(2) 材料與方法	14
(3) 結果	26
(4) 討論	29
(5) 結論與建議	32
(6) 參考文獻	34
(7) 圖、表	45

圖一: BEAS-2 細胞及 CL5 細胞經 BaP 處理 24 小時對 CYP1A1 基因表現之影響

圖二: BEAS-2B, CL5 及 SAEC 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 24 小時對 CYP1A1 基因表現之影響

圖三: BEAS2B 細胞及 CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 小時對 CYP1A1 基因表現之影響

圖四: CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 小時對 AhR 基因及蛋白表現之影響

圖五:BEAS-2B 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 小時對 AhR 基因及蛋白表現之影響

圖六:CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 72 小時對 ER α 蛋白表現之影響

圖七: CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 或 72 小時對 ER β 基因及蛋白表現之影響

圖八:BEAS-2B 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理對 AR 基因表現之影響

圖九:BaP 影響 H1355 細胞 AR 基因及蛋白表現之劑量及時間反應關係

圖十:H1355 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 72 小時對 AR 蛋白表現之影響

圖十一: CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理對 GR 基因及蛋白表現之影響

資料讀我檔案格式 p1

基因體醫學國家型計畫「臺灣肺癌基因體研究及臨床應用：著重於女性肺腺癌」
原始數據資料庫 資料讀我檔案

計畫名稱：分項計畫五：肺腺癌之環境因子及基因體毒理研究
子計畫二：油煙與二手煙在基因表現、荷爾蒙及 AhR 與癌症之關係

計畫編號：NSC 91-3112-P-040-003

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：林嬪嬪

計畫主持人服務單位：毒理所

計畫主持人職稱：副教授

研究報告中文摘要：

許多流行病學研究指出，暴露二手煙及烹飪油煙為台灣女性罹患肺癌之危險因子。4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 及 trans-trans-2,4-decadienal (DDE) 分別是二手煙及烹飪油煙中被發現之致癌物或致突變物。Benzo[a]pyrene (BaP) 是一種 aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand，目前已被發現於二手煙及烹飪油煙中。本計劃目的為探討暴露二手煙及烹飪油煙對多環芳香烴類受器(AhR)，荷爾蒙受器表現(AR, ER, GR)及雌性素代謝之影響。我們以人類氣管上皮細胞 BEAS-2B，女性肺腺癌細胞 CL5 及男性肺腺癌細胞 NCI-H1355 為研究材料，以 real-time RT-PCR assay 及 Western immunoblot 方法分析 BaP, NNK, DDE 對各種受器基因及蛋白表現之影響。目前我們已發現(1) BaP 在 BEAS-2B and CL5 細胞中活化 AhR，進而增加 CYP1A1

基因表現，但 NNK and DDE 無類似作用；(2) BEAS-2B and CL5 細胞經 BaP 處理 48 小時後，AhR 蛋白表現程度降低；(3) CL5 細胞經 BaP 處理 48 小時後，女性荷爾蒙受器 ERbeta 蛋白表現程度降低；(4) H1355 細胞經 BaP 處理 48 小時後，男性荷爾蒙受器 AR 蛋白表現程度降低。BaP 也減少 BEAS-2B 及 H1355 細胞之 AR 基因表現；但是 NNK and DDE 對 ERbeta 及 AR 並無類似的作用；(5) BaP, NNK and DDE 不會影響 GR 蛋白表現。以上結果顯示，BaP 可能經由降低 AR and ERbeta 表現，進而干擾性荷爾蒙對肺細胞之作用。

中文關鍵詞：二手煙、烹飪油煙、benzo[a]pyrene、
4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone、trans-trans-2,4-decadienal、
多環芳香烴類受器、荷爾蒙受器

Research Data Archive, Department of Health, The Executive Yuan, R.O.C.
Readme file

Project Title:

Project Number: NSC 91-3112-P-040-003

Executing Institute: Chung Shan Medical University

Principal Investigator (P.I.): Pinpin Lin

P.I. Position Title: Associate professor

P.I. Institute: Institute of Toxicology

Abstract:

Exposure to environmental tobacco smoke (ETS) and cooking oil fume (COF) are suggested to be the risk factors of female lung cancer in Taiwan. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and trans-trans-2,4-decadienal (DDE) are respectively the abundant carcinogen/mutagen found in ETS and COF. In addition, benzo[a]pyrene (BaP), an ligand for aryl hydrocarbon receptor (AhR), is one of these carcinogens found in ETS and COF. In this project, we propose that exposure to ETS and COF may alter activity and expression of AhR and steroid hormone receptors and estrogen metabolism, and furthermore, these effects associate with lung carcinogenesis. We performed our evaluation with human immortalized bronchial epithelial cells BEAS-2B, female lung adenocarcinoma cells CL5 and male lung adenocarcinoma cell lines NCI-H1355. Gene and protein expression was respectively determined with real-time RT-PCR assay and Western immunoblot. The following results are found in the first period of projects. First, BaP activated AhR and induced CYP1A1 in BEAS-2B and CL5 cells. NNK and DDE had no significant effect on AhR activation. Second, BaP decreased AhR protein levels in BEAS-2B and CL5 cells 48 hr after treatment. Third, BaP reduced estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in CL5 cells 48 hr after treatment. Fourth, BaP reduced androgen receptor (AR) protein expression in H1355 cells 48 hr after treatment. AR gene expression was reduced by BaP treatment in BEAS-2B and CL5 cells. NNK or DDE alone had no similar effects on AhR, ERbeta and AR protein levels. Fifth, BaP, NNK and DDE do not change the levels of glucocorticoid receptor in these cell lines. These data suggest that BaP might interfere function of sex hormones in lung cells through the decrease in AR and ERbeta expression. We will further examine effects of BaP, NNK and DDE on sex hormones function in lung cells.

Keywords: benzo[a]pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, trans-trans-2,4-decadienal; aryl hydrocarbon receptor, androgen receptor, estrogen receptor

(1)前言：

近年來肺癌高居台灣女性癌症死因之首位 (DOH, 1998) 而且女性華人之肺癌死亡率，高於世界肺癌死亡率之平均值(Pisani et al., 1999)。吸煙已經被確認為引起肺癌之重要危險因素(Doll and Peto, 1981)，但是台灣婦女吸煙率很低(3-4%)，台灣女性肺癌患者吸煙率也只有 10% (Ger et al., 1992) ，因此台灣女性肺癌之發生，無法以吸煙習慣解釋。台灣流行病學研究顯示，其他因素可能參與台灣女性非吸煙者罹患肺癌的機轉，例如暴露二手煙及烹飪油煙 (Ko et al., 1997; Le et al., 2001)。

流行病學研究顯示，暴露烹飪油煙是台灣女性罹患肺癌之危險因素(Ko et al., 1997; Le et al., 2001)。Ko et al.(1997)及 Le et al.(2001)等人報導，婦女烹調肉類食品時未使用抽油煙機時，會增加罹患肺癌之危險性。事先將食用油加熱產生油煙的習慣，也會增加罹患肺癌，尤其是肺腺癌的機率。烹飪油煙的成分非常複雜，食用油的主要成分是脂肪酸，食用油經加熱後會進行分解，其中不飽和脂肪酸經氧化分解後，產生多種醛類物質(Warner, 1998)。最近Wu 等人(2001)報導，花生油加熱後主要產生醛類物質。台灣許多研究發現，烹飪油煙 (COF)具致突變性及基因毒性，COF 中之致突

變物包括 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), nitro-PAH, 及脂肪酸裂解產物 (Chiang et al., 1997; Chiang et al., 1999; Wu et al., 2001)。大豆油及花生油油煙中的 PAH and nitroPAH, 包括 benzo[a]pyrene (BaP), dibenz[a,h]anthracene and 1nitropyrene (Chiang et al., 1997; Wu et al., 1999)。這些化學物質為動物致癌物, 可能也是人類致癌物。COF 中主要致突變物包括 trans-trans-2,4-decadienal (DDE) (Wu et al., 2001)。COF 經甲醇萃取的中性萃取液中, DDE 佔 50%, DDE 可能是 linoleic acid 被分解的產物, 但是目前只有以 Ames test 證實為致突變物, 其致癌性目前尚待研究。綜合流行病學研究、致突變試驗及 COF 之化學成份分析結果, 因此推論暴露 COF 可能是台灣女性肺癌之重要危險因子。

流行病學研究結果顯示, 暴露二手煙 (environmental tobacco smoke, ETS) 增加非吸煙者罹患肺癌之危險性 (CEPA, 1997)。Stockwell 等人 (1992) 發現吸煙者會增加無吸煙習慣之配偶罹患肺癌之危險性。ETS 是煙草或香煙燃燒所產生之氣體及顆粒, 或者吸煙者所呼出之煙霧所組成 (CEPA, 1997)。ETS 中至少有 250 種有毒或具致癌性之化學物質 (Hecht, 1999), 有些成分在 ETS 中比吸煙者所吸入之煙霧多 (EPA, 1992; Hecht, 1999), 動物實驗也證實 ETS 濃

縮物對小鼠皮膚致癌性比吸煙者所吸入之煙霧高(NIEHS, 2000)。雖然 ETS 產生後在空氣中被大氣稀釋，但是仍可發現與肺癌之相關性 (Stockwell et al., 1992) ETS 中主要致癌物有 PAH, azarenes, nitrosamines 及無機物質(Hecht, 1999)，PAH 中以 BaP 最被廣泛研究，其致肺癌性已被報導(IARC, 1983; Guengerich, 1992; Iwagawa et al., 1989) 另外 ETS 中重要的致癌性 nitrosamines 為 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)。已知 NNK 在小鼠會引起肺腺癌(Hecht, 1998)，最近 Anderson 等人(2001)在暴露 ETS 非抽煙肺女的尿液中，測得 NNK 之代謝物，而且 BaP 與 NNK 在 ETS 中之濃度均比吸煙者所吸入之煙霧高(Hecht, 1999)，因此推測 BaP and NNK 可能參與 ETS 引起肺癌之機轉。

許多致癌物經酵素代謝為水溶性代謝物，然後被排出體外。Cytochrome P450 參與第一步反應，但是有些代謝物反而與 DNA 或細胞其他大分子形成共價鍵，而產生鍵結物(adducts)。BaP and NNK 經代謝後均會形成 DNA 鍵結物 (Hecht, 1999)。BaP 經代謝成 7,8-diol-9,10-epoxide，再與 DNA 上 deoxyguanosine 的 N2 位置鍵結(Hecht, 1999)。已知 BaP-DNA 的存在，增加小鼠體內 LacZ marker gene 的突變率(De Vries et al., 1997) NNK 經代謝活化後產生 methyl and pyridyloxobutyl DNA 鍵結物，這些 NNK 的 DNA 鍵結物

在 NNK 對小鼠的致癌性扮演重要角色(Hecht et al., 1993)。先前我們也證實，COF 增加肺細胞的氧化緊迫(Tung et al., 2001)，因此肺細胞暴露 COF 可能產生氧化性 DNA 鍵結物。DDE 是 COF 中脂質過氧化的產物 (Wu et al., 2001)，Carvalho 等人(2000)及 Loureiro 等人(2000)報導 DDE 與 DNA 反應，會產生 2'-deoxyadenosine and 2'-deoxyguanosine，但是其生理意義目前並不清楚Hall and Grover(1990)推測，DNA 鍵結物形成後，接著可能引起基因突變，啟動癌化過程，因此 DNA 鍵結物是 COF and ETS引起肺癌發生的重要生物指標。

先前的研究中指出，香菸、ETS 及 COF 中均含有高量的 BaP。BaP 可以經由活化 AhR 進而誘發 P450 1A1 的表現(Whitlock et al.,1999)。隨著 P450 1A1 的表現量增加，BaP 被代謝活化的情形也跟著上升(Josephy,1997；Binkova et al.,1995)。先前我們已經證實，在人類肺腺癌細胞株中，BPDE-DNA adduct 的形成需要活化 AhR 誘導 CYP1A 表現(Chang et al.,1999)。AhR 為一種 helix-loop-helix/per-Arnt-sim 的轉錄因子(Whitlock et al.,1999)。當 ligand 鍵結上 AhR 時 AhR 便會活化，而環境中的 AhR ligand 包含了 PAH、halogenated aromatic hydrocarbon，如戴奧辛等；此外還有一些植物性產物，如 indole carbinols 等。然而內生性的 AhR ligand

至今尚未被純化出來。一般來說，未活化的 AhR 存在於細胞質中並與 Hsp90 結合(Perdew,1998)，一旦與 PAH 高親合性得結合後，AhR 就會很快的進入細胞核中並且與 Hsp90 分離，取而代之的在與 AhR nuclear translocator(Arnt)結合後會進而接上 CYP1A1 基因上游的 enhance element 活化 CYP1A1 的表現(Rowlands and Gustafsson,1997)。Shimizu et al.在(2000)年證實 AhR 在 BaP 造成小鼠癌症發生的過程中是必要的。在 AhR 陽性的小鼠皮下以及皮膚表面處理 BaP 後，在小鼠身上可以觀察到有皮下腫瘤以及皮膚癌的產生。反之，BaP 在 AhR 缺陷的小鼠中則喪失了其導致癌症發生的能力(Shimizu et al.,2000)。Gebremichael et al. (1996)指出 sidestream cigarette smoke(吸二手煙)能夠活化小鼠中 AhR 並增加 CYP1A1 活性。因此，AhR 的表現在 ETS 所造成的肺癌中應該也扮演很重要的角色。近來我們觀察到 AhR 主要在肺的上皮細胞以及肺癌細胞中表現。除此之外，以免疫染色的方法觀察時，肺癌細胞，尤其是肺腺癌中 AhR 的表現量都非常高。AhR 的 mRNA 表現量在一些腫瘤組織中也表現的比較多。Trombino et al. (2002)證實大鼠中乳癌腫瘤中 7,12-dimethylbenzo(a)anthracence 能夠促進 AhR 的 mRNA 及蛋白表現。綜合我們以及 Trombino et al.的資料，均指出 AhR 的表現在癌症發生的過程中會向上調控。AhR 控制某些基因的表現，

一般來說，這些基因的產物可分為兩大類，代謝外來物酵素 (xenobiotic metabolizing enzyme) 或生長調節蛋白 (growth-regulatory protein)。其中，AhR 調節的代謝外來物酵素 (xenobiotic metabolizing enzymes) 包含了 CYP1A1, cytochrome P450 1A2 及 1B1 (CYP1B1), quinone oxidoreductase, glutathione s-transferase Ya 以及 UDP-glucuronosyltransferase (Rawlands and Gustafsson, 1997)。這些代謝外來物酵素 (xenobiotic metabolizing enzyme) 可能使一些有潛在危險的外來物 (xenobiotics) 生物活化 (bioactivate) 或 (解毒) detoxify。AhR 致效劑也會誘導某些編碼 (encode) 生長調節蛋白 (growth regulatory protein) 及原致癌基因表現。這一大類中則包含了 epidermal growth factor receptor, transforming growth factor 1, plasminogen activator inhibitor 2, 以及原致癌基因 *c-jun*, *c-fos* 及 *c-myc* (Puga et al., 1992; Zhang and Shiverick, 1997; Charles and shiverick, 1997; Yang et al., 1999)。在肺腺癌中這些基因的表現也許會隨著 AhR 的向上調控而增加。

除了將外來的化學物質 (生物轉化) biotransformation 外，AhR 調控的 drug metabolizing enzyme 在代謝內生性的受質如固醇類荷爾蒙時，也扮演很重要的角色。一般認為，女性荷爾蒙 (estradiol) 的代謝主要是在 A-ring 及 D-ring 的部分發生氫氧化反應

(hydroxylation)。其中。已發現在 A-ring 氫氧化的產物，包括了 2-hydroxy estradiol 及 4-hydroxy estradiol(catechol estrogens)，在 in vitro 的情況下能夠抑制或是刺激乳癌細胞株中細胞增生(Lieher et al.,1995)。在 D-ring 氫氧化後會產生 16-hydroxy estrol，能夠刺激乳癌細胞株的細胞增生(Huang, et al.,1998)。目前已經瞭解 Estrodiol 的(氫氧化)hydroxylation 反應是經由 P450 1A1/1A2, P450 1B1 以及 P450 3A 家族等酵素所催化。Catechol estrogen 可以進一步經由 catechol-O-methyl transferase 作用在 2-OH 及 4-OH 的位置接上甲基，產生 2-或 4-methoxyestradiol。內生性的各種 estradiol 代謝產物在對抗乳癌細胞的成長當中會有相對的生理活性，例如，已發現 4-hydroxyestradiol 極容易造成倉鼠腎臟的癌症發生。另一方面，2-methoxyestradiol 則有強烈的抑制血管增生以及在 in vivo 與 in vitro 下抑制人類乳癌細胞株增生的效果(Zhu and Conney,1998)。目前大部分的 estradiol 代謝物的生理活性尚未瞭解仍待釐清。其他研究者發表了許多的 estrodiol 代謝物。某些研究發現，TCDD 會影響 estradiol 生物合成(biosynthesis)過程中所需的酵素活性以及各種 estradiol 代謝物的代謝情形(Spink et al.,1990；1994；Pang et al.,1999)。最近我們發現人類肺上皮細胞 Beas-2B 會恆常表現 AhR，而且 TCDD 能夠誘導其 CYP1A1 及 CYP1B1 mRNA 表現。一

般認為 CYP1A1 及 CYP1B1 分別催化 17 beta estradiol 的 2-hydroxylation 及 4-hydroxylation(Spink et al.,1992 ; Hayes et al.,1996)。當 BEAS-2B 細胞共同處理 TCDD 以及 17 beta estradiol 後，我們觀察到 17 beta estradiol 的 2-hydroxylation 及 4-hydroxylation 代謝產物有累積的現象。在 in vitro 的實驗中發現，estradiol 代謝情形的改變與人類乳癌有相關性(Lieher et al.,1996)。最令我們感興趣的是探索在台灣高死亡率的女性肺癌中是否也有相同的現象。

AhR 和一些類固醇類荷爾蒙接受器很相似，皆屬於細胞內的接受器。AhR 和 glucocorticoid 接受器共用同一種 chaperon 蛋白 Hsp90 (Rowlands and Gustafsson,1997 ; Bertorelli et al.,1998)。此外，AhR 與一些類固醇類荷爾蒙接受器的共同刺激者 (coactivator) 和共同抑制者 (corepressor) 有交互作用 (Nguyen et al.,1999)。TCDD 是最有效的 AhR 致效劑 (agonist)，而且能誘使實驗動物及培養的哺乳類動物細胞發生抗雌激素的效應 (Lieberman et al.,1987; Safe,1995)。因此，AhR 又別名為'孤兒雌激素接受器 (orphan estrogen receptor)'。許多研究指出，AhR 的訊息傳導路徑與其他類固醇類荷爾蒙 (例如：雌激素、睪固酮，及黃體素) 調控的生理反應，有交互干擾的現象 (Kharat and Saatcioglu,1996; Kuil et

al.,1998 ; Jana et al.,1999)。目前有一些科學家提出不同的假說試圖解釋上述的干擾機理，例如，1990 年 Spink 等人提出的增強配基代謝作用假說，1991 年 Zacharewski 等人提出的向下調控接受器的表現量假說，以及 1996 年 Kharat 和 Saatcioglu；2001 年 Chen I.I. 等人提出的 TCDD 與雌激素的訊息傳導路徑在轉錄作用階段有交互干擾的假說。總之，肺腫瘤中向上調控的 AhR，很有可能與類固醇類荷爾蒙接受器的訊息傳導路徑有交互干擾的現象。

化學致癌必須經過一連串複雜的步驟，過程中至少包括初始以及促進階段。當腫瘤初始子和腫瘤促進子協同作用時，就會容易誘發癌症的發生。BaP 和 NNK 這兩種化學物質會造成 DNA 損傷，所以屬於腫瘤初始子，而氧化性傷害則普遍地認為是腫瘤促進子 (Klaunig et al., 1998)。最近的研究指出，在人類的肺上皮細胞中，COF 有誘發氧化性傷害的現象 (Tung et al., 2001)，故 COF 可視為是腫瘤促進子的一員。因此我們假設，若 BaP、NNK 和 COF 三者共同作用，勢必會增加癌症發生的能力。另外，已知 BaP 造成癌症發生的過程必須經由 AhR 的訊息傳導路徑，因此，NNK 和 COF 有可能促進 AhR 調控的基因表現，因而增強了 BaP 造成癌症發生的能力。我們目前的研究是利用 BEAS-2B、CL5 以及小支氣管上皮的初級培養等細胞株，來探討 BaP、NNK 和 COF 與 AhR 以及其他類固

醇類荷爾蒙接受器調控的基因表現之間的交互作用關係。此外，我們還評估了當 BEAS-2B 受到 BaP、NNK 和 COF 共同作用後，細胞轉型的能力。CL5 是由 Dr. Yang, PC 等人建立的女性肺腺癌細胞株，Wang 等人於 2001 年發表的報告指出 CL5 細胞株受到 3-methylcholanthrene 作用後，會誘發 CYP1A1 和 CYP1B1 基因表現，而這兩基因是受 AhR 所調控的。BEAS-2B 則是人類正常氣管上皮細胞，再經腺病毒 12 與 SV40 雜交病毒感染得來的細胞株。Van Agen et al. 於 1997 年發表的報告指出，BEAS-2B 受到 BaP 作用後，會誘發細胞轉型及 DNA 加合物 (DNA adduct) 的生成。我們先前的研究觀察到，當 BEAS-2B 受到 TCDD 作用後，會誘發 CYP1A1 和 CYP1B1 基因表現 (初步結果，圖二)。因此，BEAS-2B 可用來當作研究 BaP 造成癌症發生和 AhR 的訊息傳導路徑間交互作用的一個很好的模型。我們同時假設當細胞轉型時，AhR 會被向上調控且增強 AhR 調控的基因表現。一旦 AhR 在轉型的細胞中被向上調控，那麼我們應可觀察到 BaP DNA 加合物的形成，AhR 調控的基因表現的增加，類固醇類荷爾蒙接受器功能的改變，以及荷爾蒙代謝作用上的改變。本計劃的研究資料將有可使我們益加了解，ETS 和 COF 的交互作用在肺癌的癌症發生過程中扮演怎樣的角色。

許多研究報告指出，AhR 與 steroid hormone receptors 發生

交互作用，進而影響彼此的訊息傳遞路徑。本計劃中我們推測，肺細胞暴露 ETS and COF後，可能改變 AhR 及 steroid hormone receptors 活性及表現，並且改變雌性素代謝，接著雌性素代謝物可能攻擊 DNA，形成 DNA 鍵結物，或者雌性素促進 AhR 活化，增加 PAH 鍵結物之形成。我們將以人類氣管上皮細胞 BEAS-2B，女性肺腺癌細胞 CL5 及男性肺腺癌細胞 NCI-H1355 為研究對象，以 BaP, NNK, DDE 為研究材料，預計完成下列工作項目：

1. 在 BEAS-2B, CL5, H1355細胞及原代人類細呼吸道上皮細胞 SAEC，探討 BaP, NNK, and DDE 對 receptors 表現及活性之影響。Receptors 包括 AhR, ER(雌性素受器), AR(雄性素受器)及 GR(glucocorticoid receptor)。
2. 在 BEAS-2B, CL5 細胞探討 BaP, NNK, and DDE 對 DNA 鍵結物形成之影響。
3. 在 BEAS-2B, CL5 細胞探討 BaP, NNK, and DDE 對 estrogen 代謝之影響。

(2)材料與方法。

一、材料：

1. 材料與藥品：

Dimethyl sulfoxide (DMSO), benzo[a]pyrene (BaP),

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-b u t a n o n e (N N K)

trans,trans,2,4-decadienal (DDE), bovine serum albumin (BSA)

trypan blue solution (2.4%), ammonium persulfate P(A

tetramethylethylenediamine (TEMED) pepstatinA, aprotinin,

leupeptin, phenylmethylsulfonyl- fluoride (PMSF), protease inhibitor

cocktail tablets 購自美國 Roche 公司；chloroform, isopropanol,

RPMI medium 1640 trypsin inhibitor, fetal bovine serum (FBS)

penicillin/streptomycin. sodium pyruvate, non-essential amino acid

(NEAA), glutamine, TRI reagent 購自美國 Molecular Research

Center 公司；LHC-9 medium, 細胞培養皿購自丹麥 Nunc 公司；

SABM medium ,Bovine Pituitary Extract(BPE), Hydrocortisone

(CC-4031), human recombinant Epidermal Growth Factor(hEGF),

Epinephrine (CC-4221), Transferrin (CC-4205), Insulin (CC-4021),

Retinoic Acid (CC-4085), Triiodothyronine (CC-4311), Gentamicin,

Amphotericin-B (CC-4081), Bovine Serum Albumin-Fatty Acid Free

(BSA-F A F) , H E P E S B u f f e r e d S a l i n e S o l u

(HEPES-BSS)(CC-5022), Trypsin/EDTA Solution (T/E) (CG5012),

Trypsin Neutralizing Solution (TNS) (5002) 購自美國 BioWhittaker, A Cambrex 公司; estrogen receptor α mouse monoclonal antibody (NCL-ER-6F11) 購自英國 Novocastra 公司; estrogen receptor β rabbit polyclonal antibody (PA1-311) 購自美國 Affinity BioReagents 公司; monoclonal anti- β -actin (A5441) 購自美國 SIGMA 公司; glucocorticoid receptor (NCL-GCR) 購自英國 Novocastra 公司; antiandrogen receptor (PG21) 購自美國 UPSTATE 公司; antiAh(Dioxin) receptor (PA313) 購自美國 Affinity BioReagents 公司; anti-mouse IgGHRP 購自美國 Santa Cruz Biotechnology 公司; anti-rabbit IgG-HRP 購自美國 Calbiochem 公司; Western Blot chemiluminescence reagent plus 購自美國 Life Sciences 公司; MMLV RT RNase 購自美國 Promega 公司; RNase inhibitor 購自美國 Amersham Pharmacia Biotech 公司; BCA protein assay reagent 購自美國 Pierce 公司; SYBR[®] Green PCR kit 購自美國 Qiagen 公司; methanol 購自聯工化學股份有限公司;

2. 人類肺細胞株之來源：

BEAS-2B 為人類正常支氣管上皮細胞株 (normal human bronchial epithelium cell lines) 購自 American Type Culture

Collection ; 人類肺癌細胞株 (human lung carcinoma cell lines)

NCI-H1355 由台北榮民總醫院胸腔腫瘤科主任蔡俊明醫師所贈予 ;

CL-5 為人類女性惡性腫瘤細胞株 (lung adenocarcinoma cell lines) ; SAEC 為人類正常小支氣管上皮細胞 (Small Airway Epithelial Cells) 購自美國 BioWhittaker, A Cambrex Company.

二、方法:

1. 細胞培養

BEAS2B 細胞株以 LHC-9 細胞培養液培養 ; H1355 細胞株以含有 5% FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine 和 100 unit/ml penicillin/streptomycin 之 RPMI 細胞培養液培養 ; CL-5 以含有 10% FBS, 0.22 % sodium bicarbonate, 0.03 % L-glutamine 和 100 unit/ml penicillin/streptomycin 之 RPMI 細胞培養液培養 ; , 並將細胞株置於含 5% CO₂ 的 37°C 恆溫培養箱內培養, 每三天更換一次新鮮的培養液, 每株細胞均間隔四~五天便須分盤培養。

細胞分盤, 首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出, 加入 10ml phosphate buffer saline (0.8 % NaCl, 0.02 % KCL, 0.11 % Na₂HPO₄) 緩衝溶液洗一下, 然後將 PBS 緩衝溶液吸出, 再加入 1ml 1x TE (0.05% trypsin、0.02 % EDTA , 為 protease, 能幫助細胞脫

離培養皿) 溶液，當 trypsin 溶液覆蓋所有細胞後，即馬上吸出，置於 37°C 培養箱 3 分鐘，可利用顯微鏡 (OLYMPUS-CK40) 觀察細胞是否已脫離培養皿，細胞脫落後，以 2ml trypsin 抑制劑 (或含有血清的細胞培養液 10ml) 沖洗細胞，再加入 8ml 培養液並將細胞吸出，置於 15ml 離心管中，於室溫離心 900 rpm (KUBOTA 2010) 5 分鐘後，去除上清液，再加入適當細胞培養液，待混合均勻後，以 5×10^5 個細胞/10 公分培養皿為培養密度種入培養皿中。

SAEC 細胞株以 SABM 細胞培養液培養; SAEC 細胞株以含有 Bovine Pituitary Extract(BPE), Hydrocortisone (CC-4031), human recombinant Epidermal Growth Factor(hEGF), Epinephrine (CC-4221), Transferrin (CC-4205), Insulin (CC-4021), Retinoic Acid (CC-4085), Triiodothyronine -431(10,C Gentamicin, Amphotericin-B (CC-4081), Bovine Serum Albumin-Fatty Acid Free (BSA-FAF) 之 SABM medium 並將細胞株置於含 5% CO₂ 的 37 °C 恆溫培養箱內培養，每兩天更換一次新鮮的培養液，這株細胞需八分滿，約四~五天便須分盤培養。SAEC 在剛解凍時，不可以離心。在 1ml 的 SAEC 細胞株分別接種在 5 個 T-25 培養皿中。(T-25 培養皿中含有 5ml 的 SABM medium)

細胞分盤，首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 2-3ml 的 HEPES-BSS(HEPES Buffered Saline Solution) 緩衝溶液洗一下，然

後將 HEPES-BSS 緩衝溶液吸出，再加入 2ml Clonetics TE solution 後，置於 37°C 培養箱 3 分鐘，可利用顯微鏡 (OLYMPUS-CK40) 觀察細胞是否已脫離培養皿，細胞脫落後，以 4ml trypsin 抑制劑中和 TE solution，再加入 2ml HEPES-BSS 將細胞吸出，置於 15ml 離心管中，於室溫離心 900 rpm (KUBOTA 2010) 5 分鐘後，去除上清液，再加入適當細胞培養液，待混合均勻後，以 3×10^6 的細胞/T-75 培養皿為培養密度種入培養皿中。(每 5cm^2 用 1ml 的 SABM medium)

2. 抽取 RNA

倒掉舊 medium，以 PBS 洗二次，加入 1ml TRI reagent/10 cm dish，於室溫下靜置 5 分鐘，吸出移至微量離心管中，加入 200 μ l 的 chloroform，激烈震盪混合後於室溫靜置 0 分鐘，以 4°C 離心 12000xg (Eppendorf Centrifuge 5415 R) 15 分鐘，將上層透明液吸出移至新的乾淨的微量離心管中，再加入等量的 isopropanol 混合均勻，於室溫靜置 10 分鐘後，4°C 離心 12000xg 10 分鐘，除去上清液，加入 1 ml 以 DEPC-H₂O (0.1% DEPC 在室溫中攪拌至完全混合以破壞 RNase 後，再經溼熱高壓滅菌除去 DEPC) 配製之 75%酒精混合均勻；於 4°C 離心 12000 rpm 5 分鐘，除去上清液並風乾，再加入適量的 DEPC-H₂O (約 50 μ l)，55°C 加熱 5 分鐘，置於冰上並以分

光光度儀 (Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec[®] 2100 pro) 測 O.D.。

3.RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction)

(一) 製備互補 DNA (cDNA)

混合 3 μ g 的 total RNA、1 μ g 的 oligo (dT)₁₈ 及 DEPC-H₂O，共 12 μ l，加熱 70 $^{\circ}$ C 15分鐘，立即置於冰上，接著加入 8 μ l 反應混合液(含 1 mM dNTP，1X MMLV RT buffer，RNase inhibitor 1U，MMLV Reverse transcriptase 10U) 於 37 $^{\circ}$ C 反應一小時，將 mRNA 反轉錄成 cDNA，最後再以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 cDNA (total 20 μ l) 保存於-20 $^{\circ}$ C。

(二) RT-PCR

RT-PCR 主要是利用 1 μ l cDNA (大約 0.5 μ g 的 total RNA) 為模板，在總反應體積為 30 μ l 的 1 \times 緩衝溶液中[10 mM TrisHCl，pH 8.8、1.5mM MgCl₂、50 mM KCl、0.1 % Triton X-100]，加入特定的 primer 使反應濃度為400 nM、0.2 mM dNTP與 1 U Taq

polymerase。使用 UNO (Biometra) 熱循環儀將基因放大，94C 3 分鐘後，為 94C 分鐘、54C 分鐘、72C 分鐘，重複 39 循環，最後 72C 分鐘。

4. 定量 PCR (quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Real-time RT-PCR)

(一) 儀器：ABI Perkin Elmer Prism 7700 Sequence Detection

System (Applied Biosystems)，以光纖管即時紀錄每一個cycle 的螢光訊號，來定量經由PCR放大的基因片段，能偵測波長500 nm至660 nm範圍之螢光。

(二) 試劑組：SYBR[®] Green PCR kit，為一種 DNA-binding dye，PCR

反應進行時，能嵌入雙股 DNA minor-groove 產生螢光。

(三) 方法：此實驗取 3 µg RNA 製備成 20µl 的 cDNA 當 template，

primer 設計與濃度如下表：

基因	Primer 序列	反應濃度 (nM)
----	-----------	--------------

<i>β-actin</i>	5'-TCATGAAGTGTGACGTGGACATC-3'	100
	5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT-3'	
<i>AhR</i>	5'-ACATCACCTACGCCAGTCGC-3'	400
	5'-TCTATGCCGCTTGGAAGGAT-3'	
<i>ERβ</i>	5'-AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG-3'	400
	5'-GACAGCGCAGAAGTGAGCATC-3'	
<i>CYP1A1</i>	5'-CACCATCCCCCACAGCAC-3'	200
	5'-ACAAAGACACAACGCCCTT-3'	
<i>CYP1B1</i>	5'-GCTGCAGTGGCTGCTCCT-3'	200
	5'-CCCACGACCTGATCCAATTCT-3'	

測量 β -actin 時，將 cDNA 稀釋 200 倍；測量其他基因表現時，cDNA 稀釋 20 倍。每個反應管總體積 25 μ l：RNase-free H₂O 4.5 μ l，SYBR Green 12.5 μ l，primer 5 μ l，template DNA 3 μ l。條件：50 $^{\circ}$ C 2 分鐘，95 $^{\circ}$ C 10 分鐘，95 $^{\circ}$ C 15 秒，60 $^{\circ}$ C 1 分鐘，重複 40 循環，最後 95 $^{\circ}$ C 15 秒，60 $^{\circ}$ C 20 秒，95 $^{\circ}$ C 15 秒。

(四) 計算方式：

機器紀錄每個 cycle 數所產生的螢光值，形成 sigmoidal-shaped amplification plots，當螢光到達閾值(threshdd)時，會紀錄其 cycle 數，稱為 C_T (threshold cycle)值，即是剛達到可以偵測到螢光的 cycle 數。

$$C_T = C_{T(\text{target gene})} - C_{T(\beta\text{-actin})}$$

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta C_T}, \text{ 此基因的相對表現量}$$

..... $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T(\text{加藥處理組})} - \Delta C_{T(\text{DMSO 控制組})}$

$$\text{induction fold} = 2^{\Delta \Delta C_T} = \text{此基因的加藥處理組}$$

相對於控制組(DMSO)所增加的倍數

5. 製備細胞均質液

AhR, ER α , ER β , AR:

細胞生長於 6 well plate待生長至八、九分滿時，以 1x PBS 緩衝溶液 (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.11% Na₂HPO₄) 洗二次，再以新鮮配置 ice-cold 150 μ l 的 homogenization buffer (2x lysis buffer : 50 mM HEPES, 40 mM sodium molybdate, 10 mM EGTA,

6 mM MgCl₂ , 20% glycerol , 1% NP-40 , 2 mM PMSF , 10 ng/ml leupeptin , 20 µg/ml aprotinin , 50 µg/ml TLCK , 50 µg/ml TPCK , 2 µg/ml pepstatinA , protease inhibitor cocktail tablets) 將細胞刮下 , 置於 1.5ml 微量離心管中 , 保持 4°C 使用 SONIFIER 250將細胞震破 , 將 Sonicator 之 Output Control : 調整到 5 ; Duty cycle : 調整到 30 % , 用清水以 10 sec/once 打一次 , 再將含有 homogenization buffer 之 sample 以 10 sec/once 打一次。於 4°C 12000 rpm (HERMLE Z 323k Centrifuge) 離心 15 分鐘後 , 上清液為細胞質部分與等體積之 2x sample buffer (125 mM Tris , 4% SDS , 25% glycerol , 4 mM EDTA pH=6.8) 混合 , 置於 100°C 沸水中煮沸 5 分鐘 , 並以 BCA protein assay 定量蛋白質。

6. BCA 蛋白定量法

本實驗方法用於樣品中含有 glycerol , SDS detergent 或 DTT 時 (若樣品中含 2-mercaptoethanol 時則不可用此方法 , 所以必須待測完蛋白後再加 2-mercaptoethanol) 。首先以 1 : 50 之比例混合 BCA reagent A 和 reagent B 成為 BCA working reagent , 並取 3µl 待測物與標準品 (1µg/µl BSA) 2.5µg 、 5µg 、 10µg 、 15µg 與 1 ml BCA working reagent 混合均勻後在 37°C 反應 30 分鐘 , 以分光光度儀

(Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec[®]2100 pro) 於波長 562nm 測吸光值，再利用線性迴歸分析與標準品 BSA 比較以求得待測物之蛋白濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

7. 西方墨點法

製備 10% 下膠 (2.5 ml lower gel buffer, 2.5 ml 40 % acrylamide-bis acrylamide, 140 μl 10% ammonium persulfate, 4.83 ml 蒸餾水, 20 μl TEMED) 4% 上膠 (1.56 ml upper gel buffer, 0.6 ml 40% acrylamide-bis acrylamide, 140 μl 10% ammonium persulfate, 3.684 ml 蒸餾水, 10 μl TEMED) 以及直立 mini acrylamide-bis acrylamide gel, 每個 well loading 50 μg 的樣品, 以 60 volt 跑 10 分鐘, 接著再以 100 volt 跑 90 分鐘。在膠快跑完的前 10 分鐘, 準備一張大小恰當的 PVDF membrane, 先用甲醇洗一下 (約 15 秒), 換成清水震盪 3 分鐘, 再換成 transfer buffer 備用。將膠卸下後, 同時與 PVDF membrane 及兩片濾紙 (3MM chromatography paper) 一起浸在 transfer 緩衝溶液中 (0.31 % Tris, 1.44 % glycine, 20 % methanol), 利用 Bio Rad-Mini Trans-Blot Cell 將膠上的蛋白轉移到 PVDF membrane 上 (100 volt、75 分鐘)。將 transfer 好的 PVDF membrane 浸在含 5 % 脫脂奶粉的 1x-TTBS 緩衝溶液 (50mM Tris, 0.2 % Tween 20, 150mM NaCl, pH 7.5) 中,

震盪 60 分鐘。再加入本實驗欲觀察之蛋白的一次抗體 rabbit polyclonal anti-AhR 抗體 1500 倍稀釋、mouse monoclonal anti-ER α 抗體 50 倍稀釋、rabbit polyclonal anti-ER β 抗體 500 倍稀釋、mouse monoclonal anti-GR 抗體 250 倍稀釋，rabbit polyclonal anti-AR, mouse monoclonal anti- β -actin 抗體 200000 倍稀釋,在 4 $^{\circ}$ C 反應隔夜 (至少 16 小時)，所有一次抗體於第一次使用完後，加入 1/100 體積的 2 % sodium azide保存於 4 $^{\circ}$ C，以便回收再利用。將處理完一次抗體之 PVDF membrane 用含有 5 %脫脂奶粉的 1x-TTBS 緩衝溶液清洗兩次，再用 1x-TTBS 緩衝溶液清洗兩次，接著在室溫下用 anti-mouse IgGHRP conjugated 5000倍稀釋或 anti-rabbit IgG peroxidase conjugated 5000倍稀釋之二次抗體於室溫下反應 1 小時。接著以含 5 %脫脂奶粉的 1x-TTBS 緩衝溶液清洗兩次，再用 1x-TTBS⁺緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.5 % Tween 20, 300 mM NaCl, pH 7.5) 清洗兩次。最後用 PBS 緩衝溶液稍微清洗 10 秒，即可與 E.C.L.呈色劑作用 1 分鐘後，以保鮮膜包好在暗房中與X-光底片 (FUJI medical X-ray film) 壓片約 1~20 分鐘。

(3)結果

首先探討 BaP 在 BEAS-2B 細胞及 CL-5 細胞對 CYP1A1 基因表現之影響。將 BEAS-2B 細胞及 CL-5 細胞處理 DMSO, 0.01 μ MBaP, 0.1 μ MBaP, 1 μ MBaP 或 10 μ MBaP, 24 小時後以 real-time RT-PCR 定量 CYP1A1 基因表現程度。結果 BEAS-2B 細胞及 CL-5 細胞在 1 μ MBaP 及 10 μ MBaP 處理下均會增加 CYP1A1 基因表現(圖一)。

接著將 BEAS-2B 細胞, CL-5 細胞及 SAEC 細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 24 或 48 小時後, 以 real-time RT-PCR 定量 CYP1A1 基因表現。結果 BEAS-2B 細胞, CL-5 細胞及 SAEC 細胞在單獨加入 BaP 或 BaP 共同處理 NNK or DDE 24 小時後會增加 CYP1A1 基因表現, 而且 BaP 共同處理藥物之下增加 CYP1A1 基因表現比 BaP 單獨處理時更高(圖二)。BEAS-2B 及 CL-5 細胞處理 48 小時後也有同樣現象 (圖三)。

第二部分工作接著探討 BaP, NNK, DDE 在 CL-5 細胞及 BEAS-2B 細胞對 AhR 基因及蛋白表現之影響。將細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 48 小時後以 Real-Time, RT-PCR 及 Western Blot 分別測 AhR 基因及蛋白表現。結果 CL5 細胞的 AhR

基因表現沒有減少, 而 BaP 單獨處理或 BaP 共同處理 NNK or DDE 時明顯減少 AhR 蛋白表現(圖四)。相同地, BEAS-2B 細胞經處理後 AhR 基因表現沒有減少, 而 AhR 蛋白表現在 BaP 單獨處理或 BaP 共同處理的藥物之下明顯減少(圖五)。

第三部份工作為探討對 ER α and ER β 表現之影響。首先探討 BaP, NNK, DDE 在 CL-5 細胞對 ER α 蛋白表現之影響。將 CL-5 細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 72 小時後以 Western Blot 測 ER α 蛋白表現。結果各種藥物處理後並未有明顯改變 ER α 蛋白表現(圖六)。接著比較 BaP, NNK, DDE 在 CL-5 細胞對 ER β 基因及蛋白表現之影響。將 CL-5 細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 48 小時後(圖七 a) 或 72 小時後(圖七 b)以 real-time RT-PCR 及 Western Blot 分別測 ER β 基因及蛋白表現。結果 ER β 基因及蛋白表現在 BaP 單獨處理或 BaP 共同處理 NNK or DDE 時明顯減少(圖七)。

第四部分工作為探討對 AR 基因表現之影響。將 BEAS-2B 細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 48 小時後(圖八 a) 或 72 小時後(圖八 b)以 real-time RT-PCR 測 AR 基因表現。結果 AR 基因表現

經 BaP 單獨處理或 BaP 共同處理 NNK or DDE 時明顯減少(圖八)。

我們也探討 BaP 在 H1355 細胞影響 AR 基因及蛋白表現之劑量反應與時間之關係。將 H1355 細胞處理 DMSO, 0.1 μ MBaP, 1 μ MBaP, 24 小時後(圖九 a), 48 小時後(圖九 b) 或 72 小時後(圖九 c)以 real-time RT-PCR 及 Western Blot 分別測 AR 基因及蛋白表現。結果 1 μ MBaP 處理 48 或 72 小時後顯著降低 AR 基因及蛋白表現(圖九)。接著探討 BaP, NNK, DDE 對 H1355 細胞 AR 蛋白表現之影響。將 H1355 細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 72 小時後以 Western Blot 測 AR 蛋白表現。結果 AR 蛋白表現在 BaP 單獨處理或 BaP 共同處理 NNK or DDE 時明顯減少(圖十)。

最後探討 BaP, NNK, DDE 在 CL-5 細胞對 GR 基因及蛋白表現之影響。將 CL-5 細胞處理 DMSO, 1 μ MBaP, 1 μ MNNK, 10 μ MDDE, 1 μ MBaP+1 μ MNNK, 1 μ MBaP+1 μ MNNK+10 μ MDDE, 48 小時後以 real-time RT-PCR 測 GR 基因表現(圖十一 a)或 72 小時後 Western Blot 測 GR 蛋白表現(圖十一 b)。結果各種藥物處理後並未有明顯改變 GR 基因及蛋白表現。(圖十一)

(4) 討論

目前為止我們已經分析 BaP, NNK, DDE 對 receptors 基因及蛋白表現之影響。其中只有 BaP 降低 AhR, ERbeta and AR 蛋白表現，而 NNK or DDE 單獨處理並未影響 receptors 表現，當 BaP 與 NNK or DDE 共同處理時仍然影響 receptors 表現，但是 BaP, NNK and DDE 均不影響 GR 表現。

在 BEAS-2B 細胞中 0.1 μ M BaP 誘導 CYP1A1 基因表現，而且伴隨著降低 AhR 蛋白表現，而 AhR 基因表現並未受影響。AhR 蛋白表現降低的現象已被證實是因為 AhR 蛋白被活化，啟動 protease 作用所引起的，而非影響 AhR 基因轉錄。因此推測 BaP 應該能被 BEAS-2B 細胞代謝，進一步形成 DNA 鍵結物。同時處理 1 μ M NNK or 10 μ M DDE 並未影響 BaP 誘導 CYP1A1 及降低 AhR 蛋白表現之作用，推測 NNK or DDE 不會影響 BaP 活化 AhR，誘導 CYP1A1 之作用。

BEAS-2B 及 H1355 細胞經 0.1 μ M BaP 處理 48 或 72 小時後，AR 基因表現明顯下降，同時 H1355 細胞的 AR 蛋白表現也降低，證實 BaP 經由降低 AR 基因轉錄，而減少其蛋白表現，此現象是否與 AhR 活化或 AhR 蛋白減少有關，仍不清楚，而且 BaP 對 AR 活

性之影響，尚待進一步評估。本實驗室的肺細胞株雖然均有 AR 基因表現，但只有 H1355 細胞之 AR 蛋白可以西方墨點法偵測到，AR 在肺細胞中所扮演之角色仍然不清楚，但有動物實驗證實，缺乏 testosterone 或干擾 AR 會影響肺部發育及肺泡中介面活性劑之分泌，因此 BaP 對 AR 表現之影響應具有某種生理意義，值得進一步探討。本實驗室目前正在探討 BaP 降低 AR 蛋白及基因表現是否與活化 AhR 有關，或者與 BaP 代謝物形成之的 DNA 鍵結物有關。另外也著手了解肺細胞之 AR 是否能被 testosterone 活化而具有生理功能。

本實驗室的資料顯示，只有女性肺細胞株表現 ERalpha，但是 BaP, NNK, DDE 不會影響 CL5 細胞之 ERalpha 蛋白表現。然而所有肺細胞均表現 ERbeta，但是 BaP 只會降低 CL5 細胞的 ERbeta 蛋白表現，對 BEAS-2B 及 H1355 細胞並無類似作用，此作用之專一性是否與性別有關，目前仍不清楚。我們將進一步研究 BaP 是否影響 CL5 細胞的 ERbeta 基因表現及活性。本實驗室初步結果顯示，ERbeta 拮抗劑會抑制肺細胞生長，因此 ERbeta 在肺細胞可能具有維持細胞生長之功能，如果 BaP 也影響 ERbeta 活性，將進而影響細胞生長，至於 ERbeta 調控肺細胞哪些基因表現，尚待進一步研究。

綜合上述結果，BaP 分別降低男性(H1355)或女性(CL5)肺細胞株的 AR 或 ERbeta 蛋白表現，反過來我們將探討 testosterone or 17-beta estradiol 分別在 H1355 或 CL5 細胞是否影響 BaP 活化 CYP1A1，降解 AhR 蛋白之作用。

截至目前為止，單獨處理 NNK or DDE不會影響 receptors 基因或蛋白表現，而且也不會干擾或加強 BaP 對 receptors 的影響，因此推測 NNK and DDE 可能不會經由影響 receptors 而對肺細胞產生毒性。但是也有可能劑量太低，其中 DDE 的劑量已經引起部分細胞死亡，因此無法再提高其劑量，但我們將嘗試提高 NNK 的劑量，再檢測對 receptors 蛋白表現之影響。NNK or DDE應該分別引起 methylated or oxidative DNA鍵結物因此我們將與國衛院環職組合作，分析細胞經 NNK or DDE 處理後，形成 methylated or oxidative DNA 鍵結物的量。另外本實驗室發現 10 μ M DDE 具有細胞毒性，因此將進一步分析細胞是否進行凋亡或 necrosis。

(5) 結論與建議。

一、結論

1. 在 BEAS-2B 細胞中 0.1 μ M BaP 誘導 CYP1A1 基因表現，而且伴隨著降低 AhR 蛋白表現，而 AhR 基因表現並未受影響。
2. 處理 10 μ M BaP 48小時後，分別降低男性(H1355)或女性(CL5)肺細胞株 AR 或 ERbeta 蛋白表現，而且可能經由降低基因轉錄所致。
3. 單獨處理 1 μ M NNK or 10 μ M DDE 不會影響 receptors 基因或蛋白表現，而且也不會干擾或加強 BaP 對 receptors 的影響。
4. BaP, NNK and DDE 均不影響肺細胞表現 GR。

二、建議

1. 本實驗室將以 reporter gene assay，進一步探討 BaP 對 AR and ER 活性之影響。另外將檢測 testosterone or 17 beta-estradiol 是否能活化肺細胞的 AR or ER，進而促進細胞生長。
2. 本實驗室將探討 testosterone or 17 beta-estradiol 對 BaP 活化 AhR 之影響。
4. 本實驗室將與國衛院環職組合作，以 LC-MASS 分析細胞經 BaP,

NNK or DDE 處理後，形成 BPDE, methylated or oxidative DNA 鍵結物的量。

5. 本實驗室將與國衛院環職組合作，以 LC-MASS 分析細胞經 BaP, NNK or DDE 處理後對 17beta-estradiol 代謝物形成之影響。

(6) 參考文獻：

Anderson KE, Carmella SG, Ye M, Bliss RL, Le C, Murphy L, Hecht SS: Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in nonsmoking women exposed to environmental tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:378-381.

Andrianarison RH, Rabinovitch-Chable H, Beneytout JL: Oxodiene formation during the *Vicia sativa* lipoxygenase catalyzed reaction: occurrence of dioxygenase and fatty acid lyase activities associated in a single protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1002-1009.

Arnold JT, Wilkinson BP, Sharma S, Steele VE: Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Res.* 1995;55: 537-543.

Bartosiewicz M, Penn S, Buckpitt A: Applications of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo[a]pyrene and trichloroethylene. *Environ Health Perspect* 2001;109: 71-74.

Bertorelli G, Bocchino V, Olivieri D: Heat shock protein interactions with the glucocorticoid receptor *Pulm Pharmacol Ther* 1998;11 :7-12.

Binkova B, Lewtas J, Miskova I, Lenicek J, Sram R: DNA adducts

and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogenesis* 1995;16: 1037-1046.

Carvalho VM, Asahara F, Di Mascio P, de Arruda Campos IP, Cadet J, Medeiros MH: Novel 1-(*N*)-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. *Chem Res Toxicol* 2000;13: 397-405.

CEPA, Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency. Office of Environmental Health Hazard Assessment. 1997. IARC.

Chang KW, Lee H, Wang J, Chen SY, Lin P: Differential response to benzo[a]pyrene in human lung adenocarcinoma cell lines: the absence of aryl hydrocarbon receptor activation. *Life Sci.* 1999;65: 1339-1349.

Chen H, Hsieh T, Thomas S: Identification of estrogen-induced genes downregulated by AhR agonists in MCF-7 breast cancer cells using suppression subtractive hybridization. *Gene* 2001;262:207-214.

Charles G, Hiverick K: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases mRNA levels of interleukin-1, plasminogen activator, and tumor necrosis factor in human uterine endometrial adenocarcinoma RL92 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997;238: 338-342.

Chiang TA, Wu P-F, Wang L-F, Lee H, Lee H-C, Ko Y-C:
Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of
fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Mutat Res*
1997; 381: 157-161.

Chiang T-A, Wu P-F, Ying L-S, Wang L-F, Ko Y-C: Mutagenicity and
aromatic amine content of fumes from heated cooking oils
produced in Taiwan. *Food Chem Toxicol* 1999;37: 125-134.

Department of Health, the Executive Yuan. 1997 Republic of China:
General Health Statistics. *In: Health and Vital Statistics*,
Republic of China. R.O.C. Press Taipei, 1998;pp. 82-89.

De Vries A, Dolle ME, Broekhof JL, Muller JJ, Kroese ED, van Kreijl
CF, Capel PJ, Vijg J, van Steeg H: Induction of DNA adducts
and mutations in spleen, liver and lung of X-chromosomal/lacZ
transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene:
correlation with tumour development. *Carcinogenesis*, 1997;18:
2327-2332.

Doll, R. and Peto, R. The causes of cancer. Quantitative estimates
of avoidable risks of cancer in the United States today. 1981
Oxford: Oxford University Press.

EPA, Office of Environmental Health Hazard Assessment,
respiratory health effects of passive smoking: lung cancer other
disorders. Washington (DC), 1992.

Ger L-P, Liou S-H, Shen C-Y, Kao S-J, Chen K-T: Risk factors of lung cancer. *J. Formosan Med. Assoc.* 1992;91: S222-231.

Gebremichael A, Tullis K, Denison MS, Cheek JM, Pinkerton KE: Ah-receptor-dependent modulation of gene expression by aged and diluted sidestream cigarette smoke. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141: 76-83.

Gierthy JF, Lincoln DW, Gillespie MB et al: Suppression of estrogen-regulated extracellular plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res* 1987;47: 6198-6203.

Guengerich FP : Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.* 1992;54: 17-61.

Hall, M. and Grover, P.L. Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation, and tumor initiation. In: C. S. Cooper and P. L. Grover (eds) *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I*. Berlin: Springer-Verlag. 1990:327-372.

Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR: 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9776-9781.

Hecht SS, Carmella SG, Foiles PG, Murphy SE, Peterson LA: Tobacco-specific nitrosamine adducts studies in laboratory animals and humans. *Environ Health Perspect* 1993;99: 57-63.

Hecht SS Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998;11:559-603.

Hecht SS: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Natl Cancer Inst* 1999;91: 1194-1210.

Huang Z, Guengerich FP, Kaminsky LS: 16-hydroxylation of estrone by human cytochrome P450 3A4/5. *Carcinogenesis*, 1998;19(5):767-872

Iwagawa M, Maeda T, Izumi K, Otsuka H, Nishifuji K, Ohnishi Y, Aoki S: Comparative dose-response study on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene and benzo[a]pyrene in F334 rats. *Carcinogenesis*, 1989;10: 1285-1290.

Jana NR, Sarkar S, Ishizuka M, Yonemoto J, Tohyama C, Sone H: Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Commun* 1999;256: 462-468.

Joseph, P.D. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis. In Joseph, P.D. (ed) *Molecular Toxicology*. 1997 Oxford University Press. Inc. New York, 1997: 334-347.

Kharat I, Saatcioglu AN: Estrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor.

J Biol Chem 1996;271: 10533-10537.

Klaunig JE, Xu Y, Icenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr: The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 106, (Suppl) 1998;1:289-295.

Kuil CW, Brouwer A, van der Saag PT, van der Burg B: Interference between progesterone and dioxin signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1998;273: 8829-8834.

IARC. Polynuclear aromatic compounds, part 1, chemical, environmental and experimental data. IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon (France): IARC 1983; 32:33-451.

Ko YC, Lee GH, Chen MJ, Huang GC, Chang WY, Lin HJ, Wang HZ, Chang PY: Risk factors for primary lung cancer among nonsmoking women in Taiwan *Inter. J. Epidemiol.* 1997;26: 24-31.

Le CH, Ko YC, Cheng LS, Lin YC, Lin HJ, Huang MS, Huang JJ, Kao EL, Wang HZ: The heterogeneity in risk factors of lung cancer and the difference of histologic distribution between genders in Taiwan. *Cancer Causes Control* 2001;12: 289-300.

Lieber JG, Ricci MJ: 4-hydroxylation of estrogens as markers of human mammary tumors *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

1996;**93**:329403296

Loureiro AP, Di Mascio P, Gomes OF, Medeiros MH:
Trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem Res Toxicol* 2000;13 601-609.

NIEHS Report on carcinogens, 9th edition, 2000.

Nguyen TA, Hoivik D, Lee JE, Safe S: Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 1999;367, 250-257.

Pang S, Cao JQ, Kazanietz MA, Hayes CL, Sutter TR, Spink DC :
Inductive and Inhibitory Effects of Non-substituted Polychlorinated Biphenyls on Estrogen Metabolism and Human Cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Biochem. Pharmacol* 1999;**58**:29-38

Perdew G H: Association of the Ah receptor with the 90kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 1988;263, 13802-13805.

Pisani P, Parkin D M, Bray F, Ferlay J: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83: 18-29.

Puga A, Maier A, Medvedovic M: The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60: 1129-1142.

Puga A, Nebert DW, Carrier F: Dioxin induces expression of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.* 1992;11: 269-281.

Rowlands JC, Gustafsson J-K: Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 1997;27: 109-134.

Safe S: Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol Therap* 1995;67: 247-281.

Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T: Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 779-782.

Spink DC, Lincoln DW 2nd, Dickerman HW, Gierthy JF: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 beta-estradiol metabolism in MCF breast tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87: 6917-6921.

Spink DC, Eugster HP, Lincoln DW 2nd, Schuetz JD, Schuetz EG, Johnson JA, Kaminsky LS, Gierthy JF: 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Arch Biochem Biophys* 1992 ;293: 342-3448.

Spink DC, Lincoln DW, Dickerman HW, Gierthy JF
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Caused an Extensive
Alternation of 17 β -Estradiol Metabolism in MCF Breast
Tumor Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87:6917-6921

Spink DC, Hayes CL, Young NR, Christou M, Sutter TR, Jefcoate
CR, Gierthy JF: The Effect
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin On Estrogen Metabolism
In MCF-7 Breast Cancer Cells: Evidence For Induction Of A
Novel 17 BetaEstradiol 4Hydroxylase. *J Steroid Biochem
Mol Biol*, 1994;51: 251-8.

Stockwell HG, Goldman AL, Lyman GH, Noss CI, Armstrong AW,
Pinkham PA, Candelora EC, Brusa MR: Environmental tobacco
smoke and lung cancer risk in nonsmoking women. *Natl
Cancer Inst* 1992;84: 1417-1422.

Tung YH, Ko JL, Liang YF, Yin L, Pu Y, Lin P: (2001) Cooking oil
fume-induced cytokine expression and oxidative stress in
human lung epithelial cells. *Environ Res* 2001;87: 47-54.

Van Agen B, Maas LM, Zwingman IH, Van Schooten FJ, Kleinjans
JCS: BaPDNA adduct formation and induction of human
epithelial lung cell transformation. *Environ Mol Mutagen*
1997;30: 287-292.

Wang HW, Chen TL, Yang PC, Ueng TH: Induction of cytochromes
P4501A1 and 1B1 by emodin in human lung carcinoma

cell line CL5. *Drug Metab Dispos* 2001;29: 1-7.

Warner, K. Chemistry of frying fats/n 'Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology' (C. C. Akoh and D. B. Min, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York 1998;167-178.

Whitlock Jr, JP Inducton of cytochrome P4501A1*Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39: 103-125.

Wu P-F, Chiang T-A, Ko YC , Lee H: Genotoxicity of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Environ. Res* 1999;80: 122-126.

Wu SC, Yen G, CSheu F: Mutagenicity and identification of mutagenic compounds of fumes obtained from heating peanut oil. *J Food Prot* 2001;64: 240-245.

Yang JH, Thraves P, Dritschilo A, Rhim JS: Neoplastic transformation of immortalized man keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res* 1992;52: 3478-3482.

Yang J-H, Vogel C Abel :JA malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibits altered expressions of growth regulatory factors. *Carcinogenesis* 1999;20: 13-18.

Zacharewski T, Harris M, Safe S: Evidence for the mechanism of

action of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated decrease of nuclear estrogen receptor levels in wild type and mutant mouse Hepa 1c1c7 cells. *Biochem Pharmacol* 1991;41: 1931-1939.

Zhang L, Shiverick KT: Benzo[a]pyrene. But not 2,3,7,8-

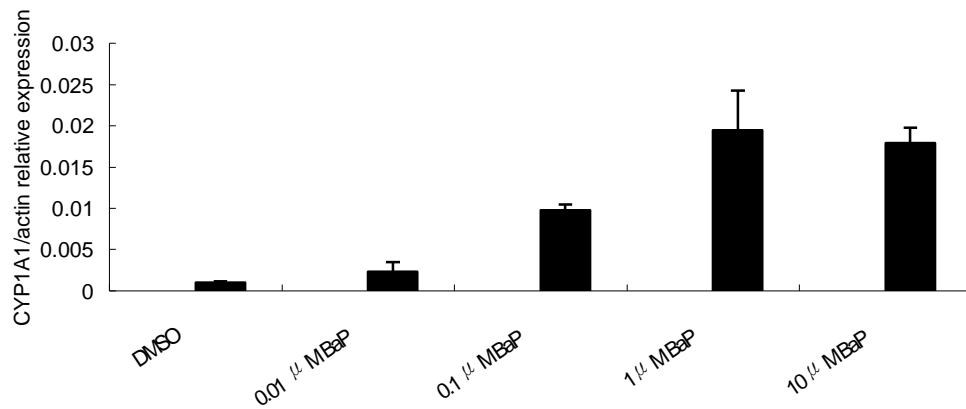
tetrachlorodibenzo-p-dioxin, alters cell proliferation and-myc and growth factor expression in human placental choriocarcinoma JEG-3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 1997;231: 117-120.

Zhu BT, Conney AH: Functional role of estrogen metabolism in target cells: reviews and perspectives. *Carcinogenesis*, 1998;19: 1-27.

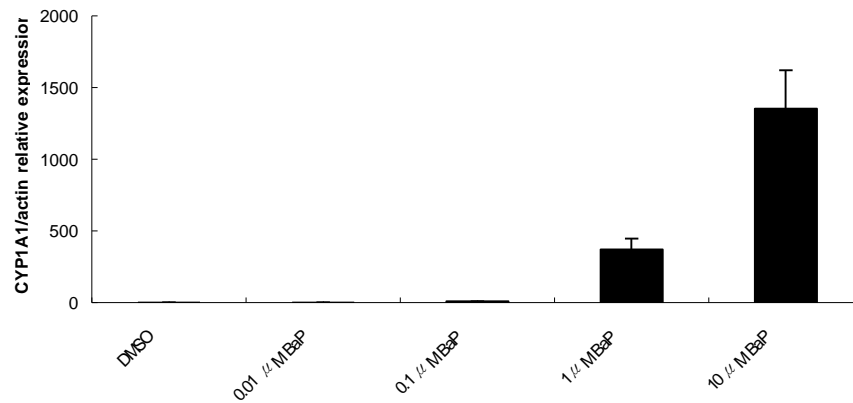
(7)圖、表

圖一: BEAS-2B 細胞及 CL5 細胞經 BaP 處理 24 小時對 CYP1A1 基因表現之影響

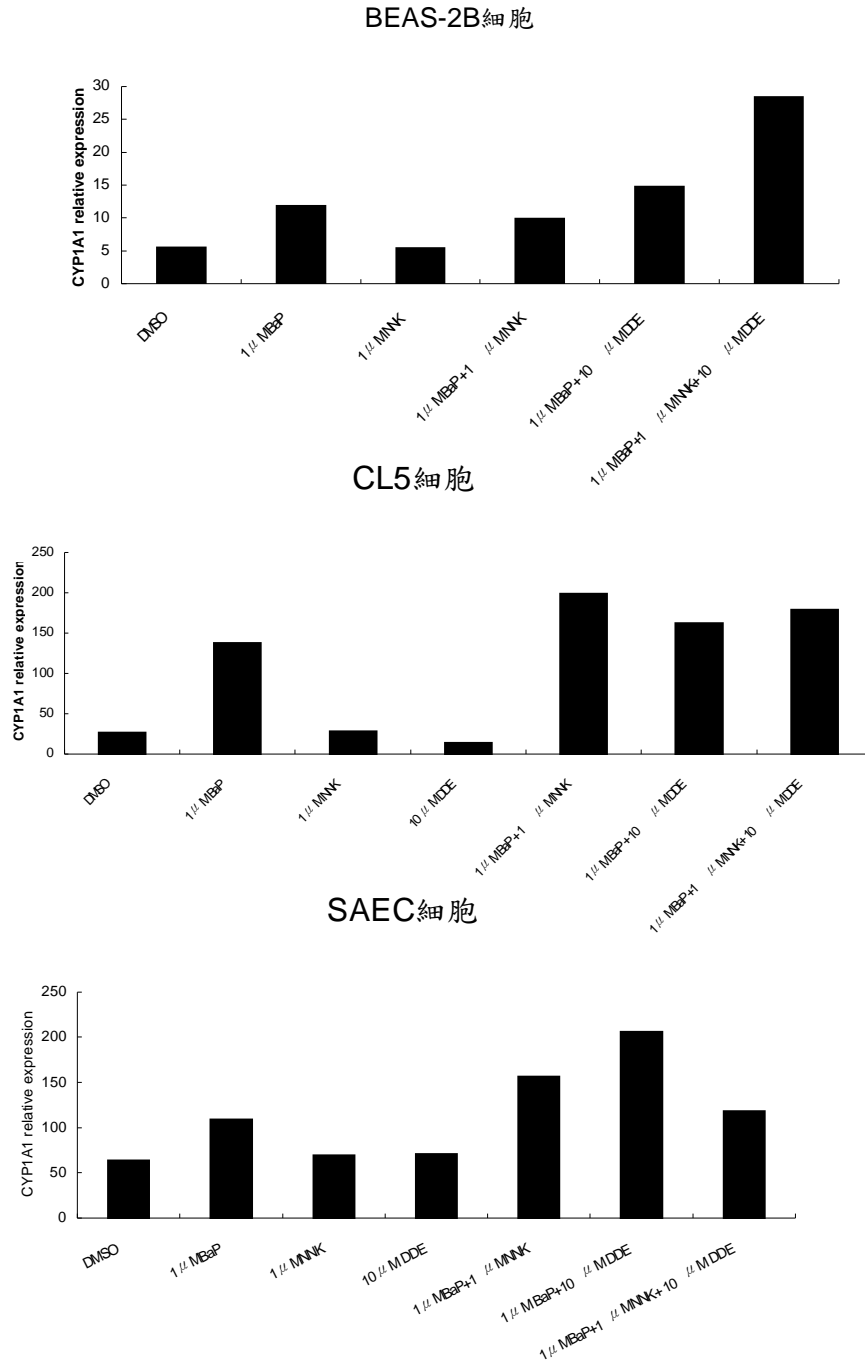
BEAS2B 細胞:



CL5 細胞:

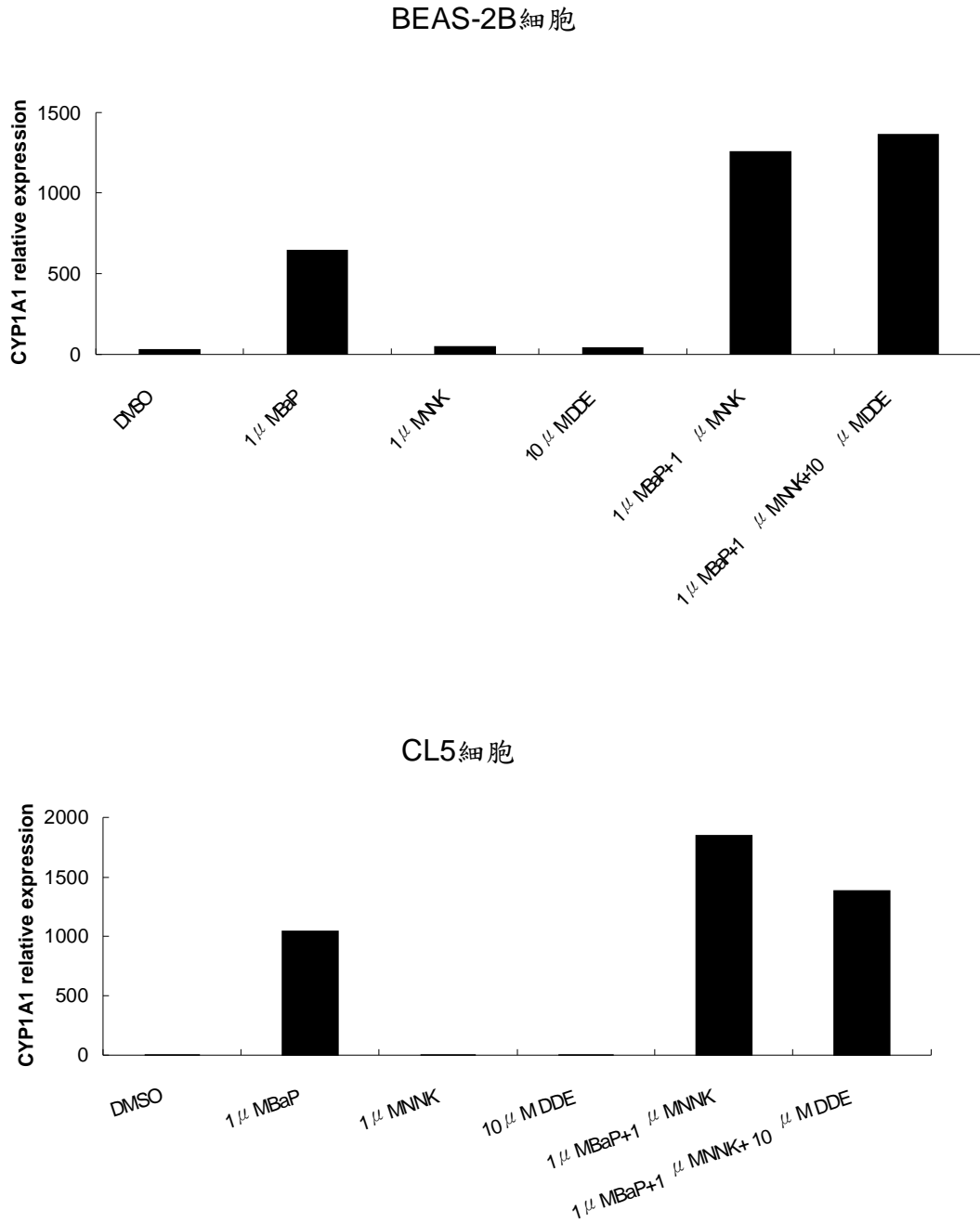


圖二: BEAS-2B, CL5 及 SAEC 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 24 小時
對 CYP1A1 基因表現之影響



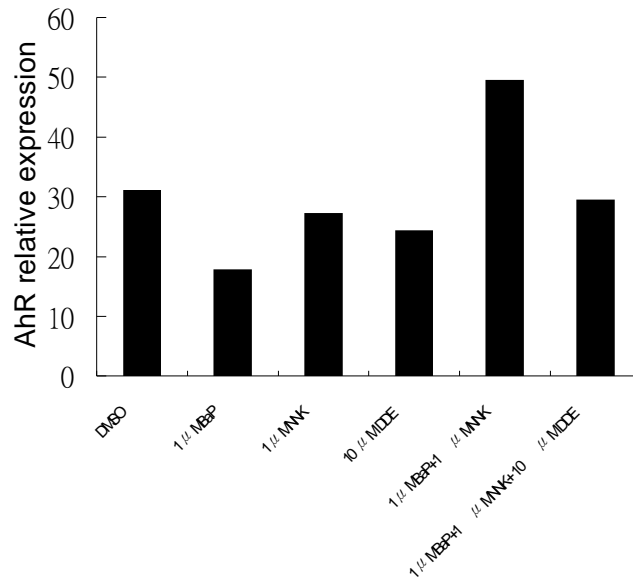
圖三: BEAS-2B 細胞及 CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 小時對

CYP1A1 基因表現之影響

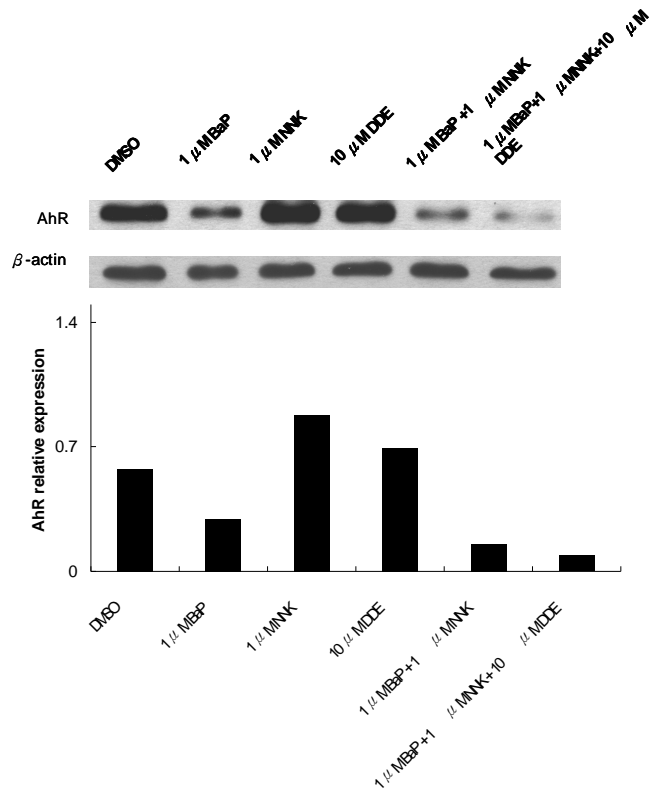


圖四:CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 小時對 AhR 基因及蛋白表現之影響

Real-time RT-PCR

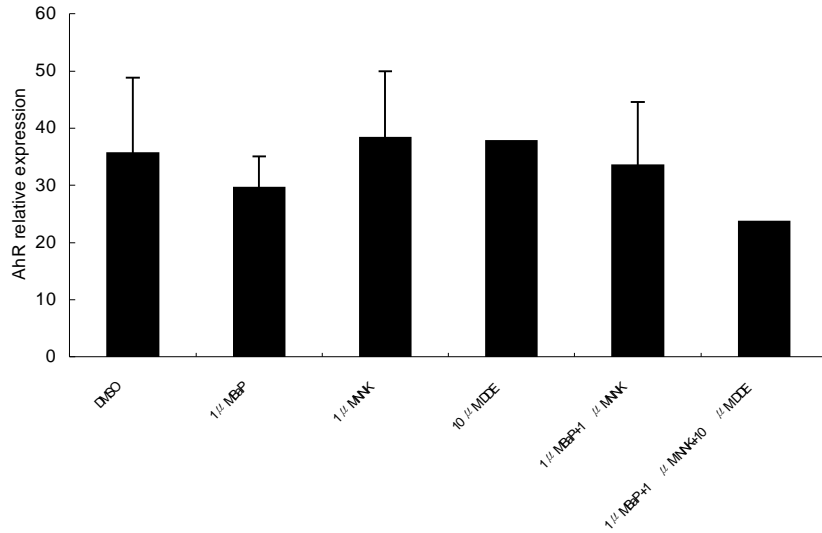


Western blot

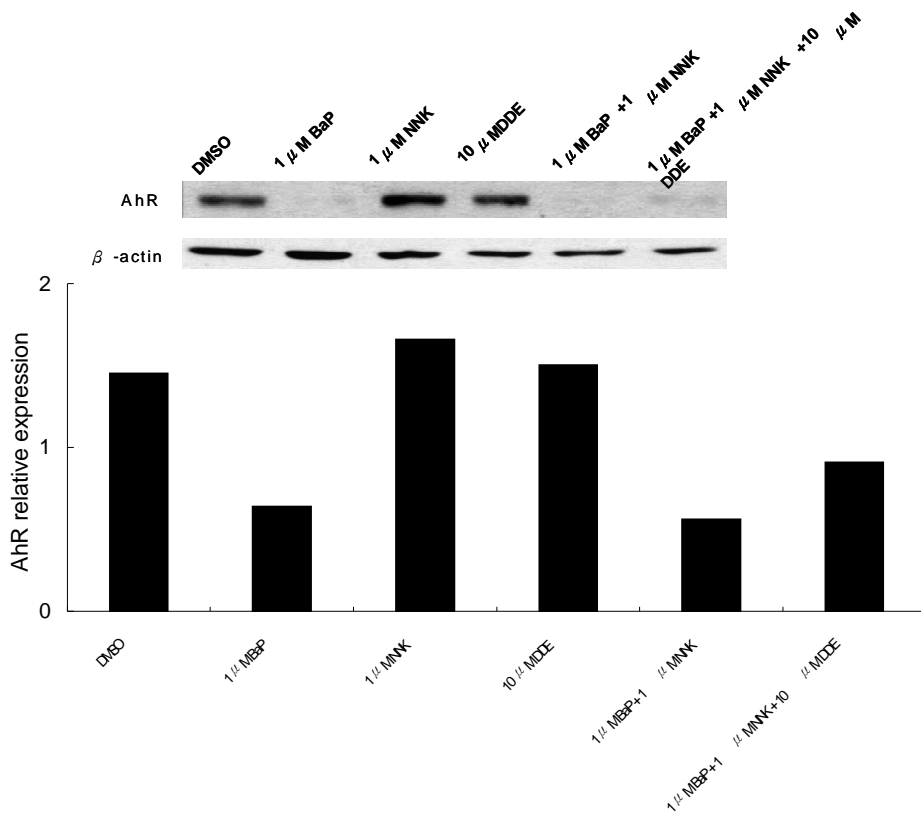


圖五:BEAS-2B 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 小時對 AhR 基因及
 蛋白表現之影響

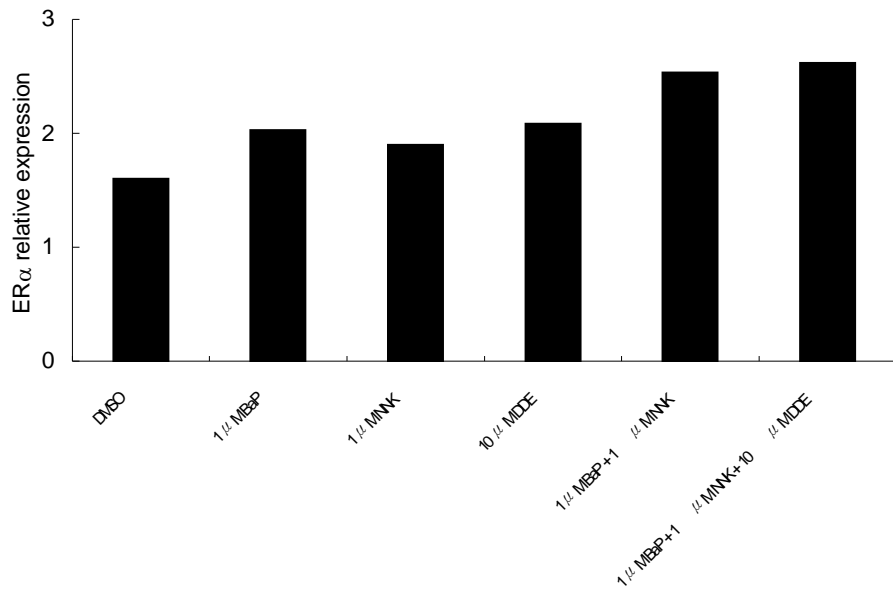
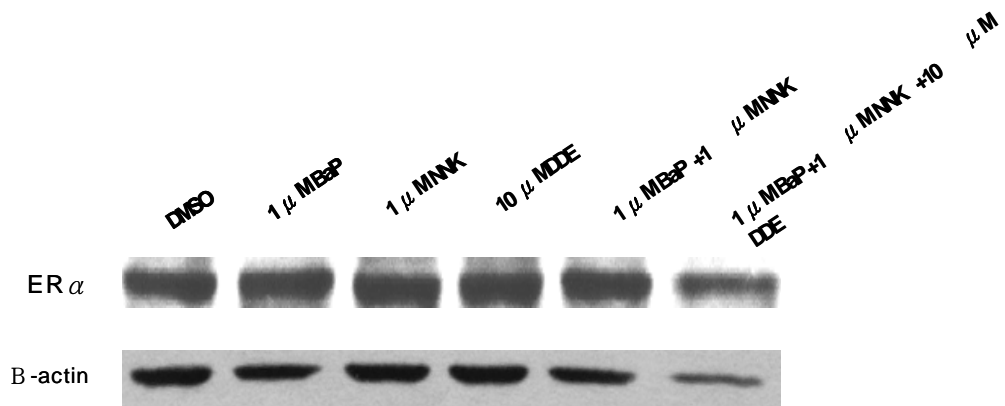
Real-time RT-PCR



Western blot

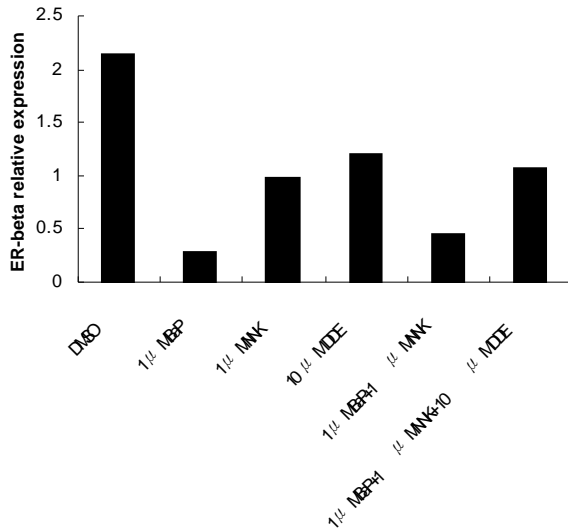


圖六:CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 72 小時對 ER α 蛋白表現之影響

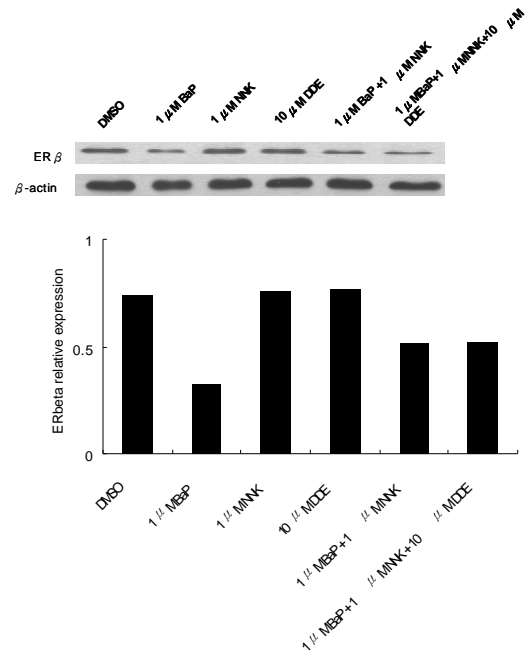


圖七：CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 48 或 72 小時對 ERβ 基因及蛋白表現之影響

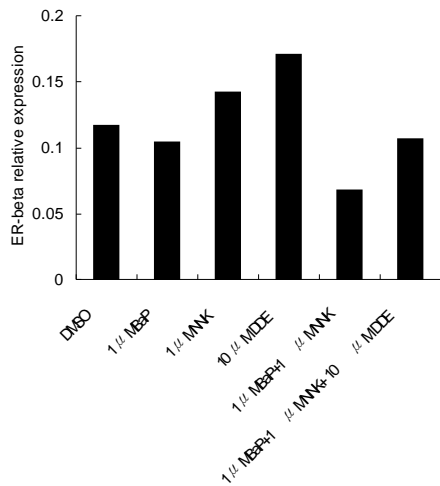
48 小時 Real-time RT-PCR



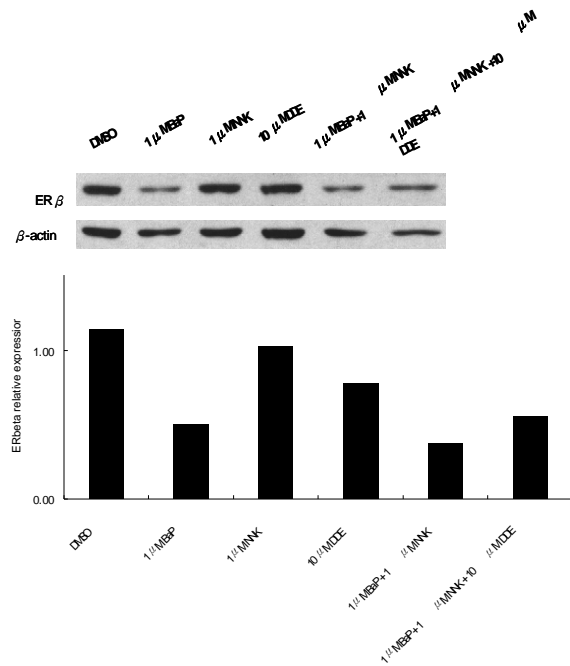
Western Blot



72 小時 Real-time RT-PCR

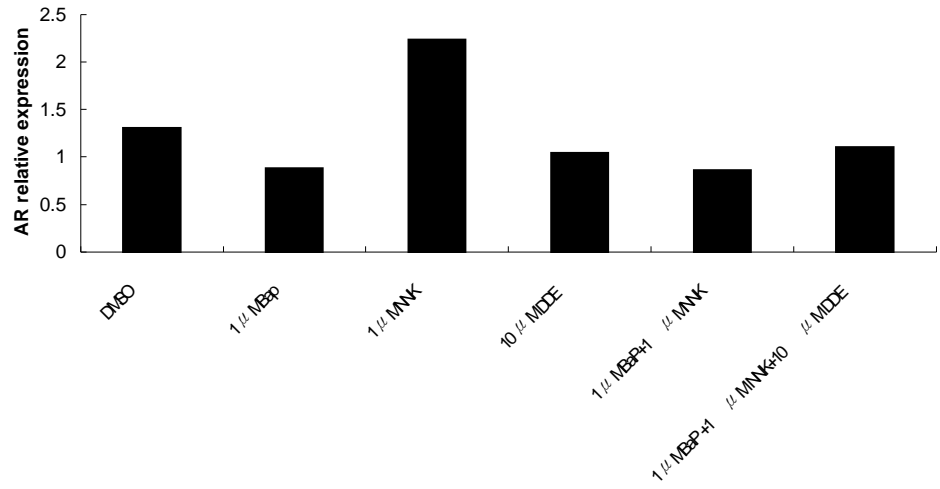


Western Blot

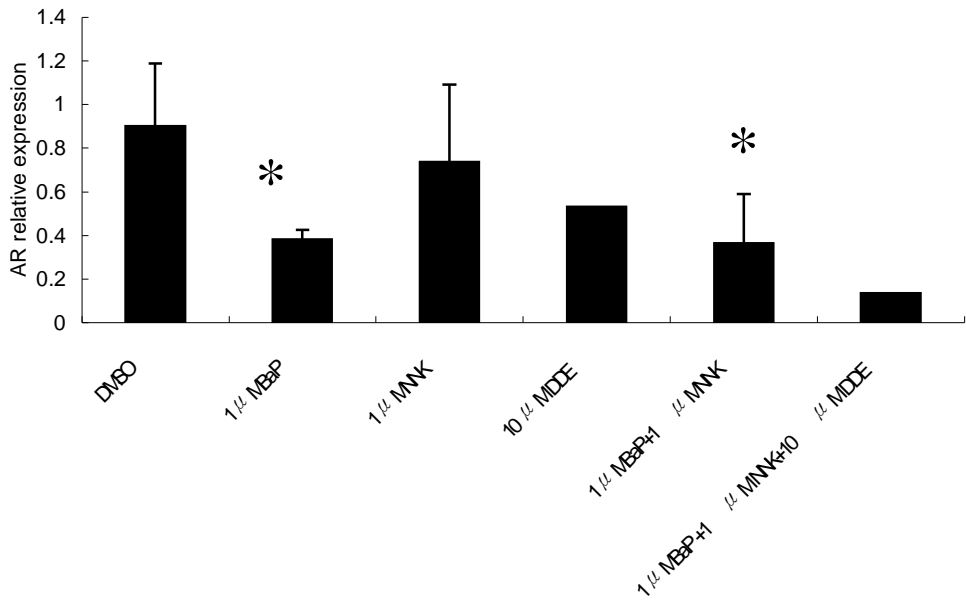


圖八: BEAS-2B 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理對 AR 基因表現之影響

48 小時



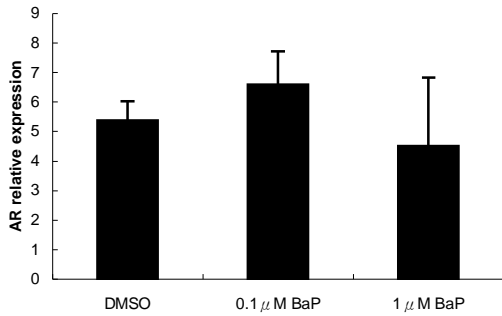
72 小時



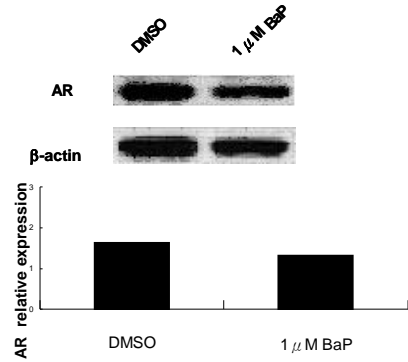
圖九: BaP 影響 H1355 細胞 AR 基因及蛋白表現之劑量及時間反應關係

(圖 a): 24 小時

Real-time RT-PCR

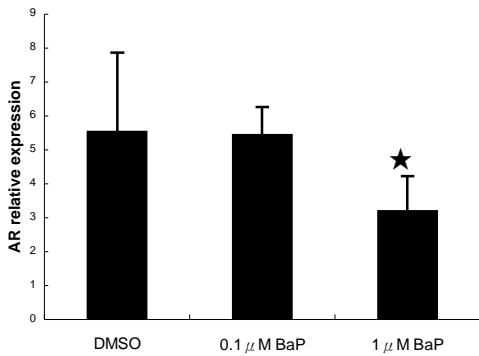


Western Blot

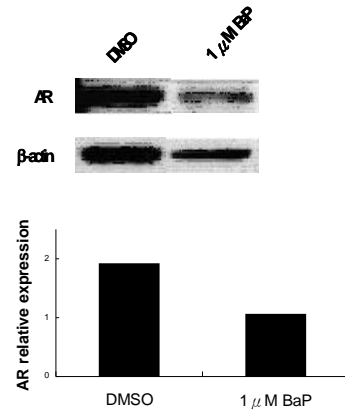


(圖 b): 48 小時

Real-time RT-PCR

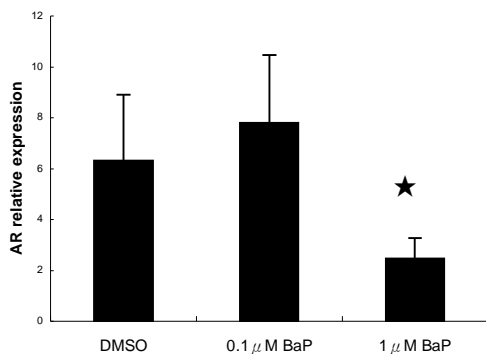


Western Blot

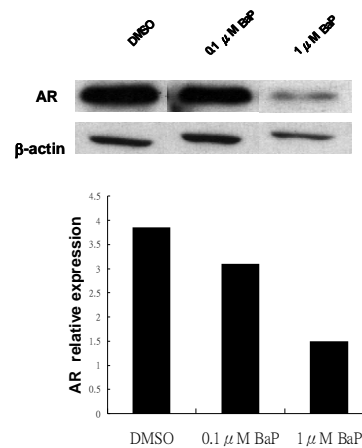


(圖 c): 72 小時

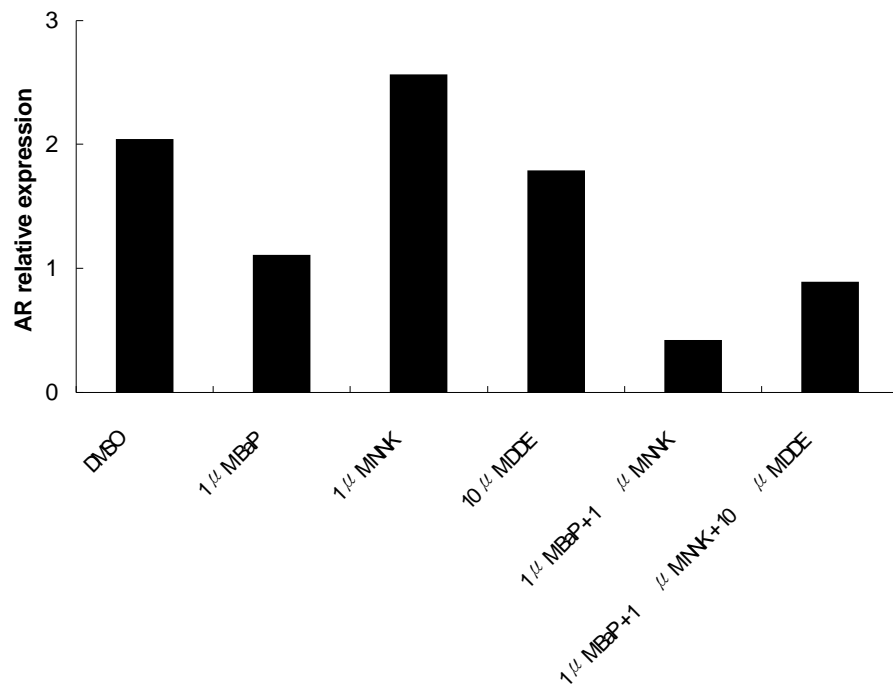
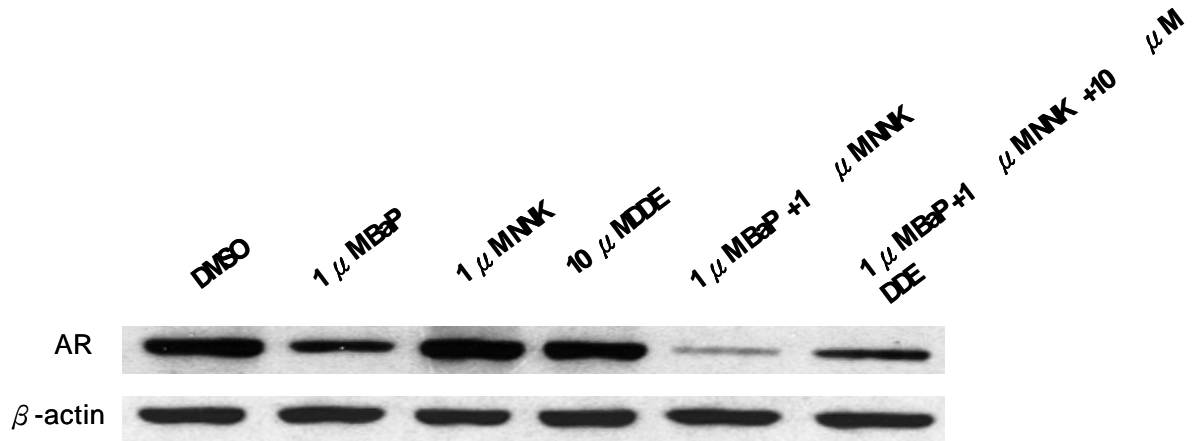
Real-time RT-PCR



Western Blot



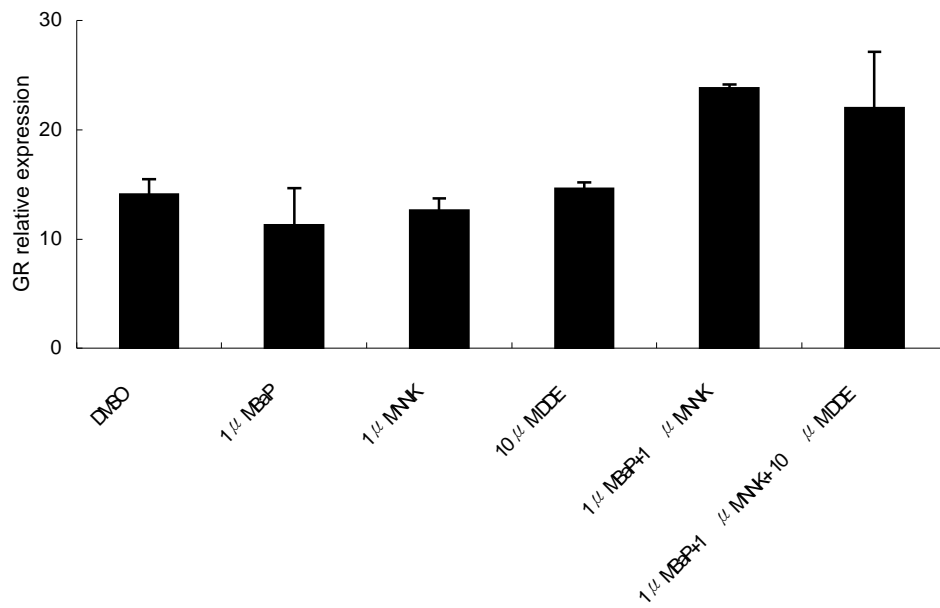
圖十: H1355 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理 72 小時對 AR 蛋白表現之影響



圖十一：CL5 細胞經 BaP, NNK, DDE 處理對 GR 基因及蛋白表現之影響

(圖 a): 48 小時

Real-time RT-PCR



(圖 b): 72 小時

Western Blot

