

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討多環芳香烴於肺癌細胞迴避 G1 期防禦及抗凋亡機制

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-024-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：柯俊良

計畫參與人員：廖建皇 吳松鎔 翁甄憶 胡哲榮

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 25 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

探討多環芳香烴於肺癌細胞迴避 G1 期防禦及抗凋亡機制
Poly-arylhydrocarbons evade cellular defense mechanism of G1 arrest and
anti-apoptosis in lung cancer cells

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2320-B040-024

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：柯俊良

共同主持人：

計畫參與人員：廖建皇 吳松鎔 翁甄憶 胡哲榮

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 94 年 10 月 25 日

可供推廣之研發成果資料表

 可申請專利 可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱：探討多環芳香煙於肺癌細胞迴避 G1 期防禦及抗凋亡機制 計畫主持人：柯俊良 計畫編號：NSC 93-2320-B040-024 學門領域：BF3
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：
可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

※ 1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。

※ 2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

※ 3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討多環芳香烴於肺癌細胞迴避 G1 期防禦及抗凋亡機制

Poly-arylhydrocarbons evade cellular defense mechanism of G1 arrest and anti-apoptosis in lung cancer cells

計畫編號：NSC93-2320-B040-024

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：柯俊良 中山醫學大學醫學分子毒理所

一、 中文摘要

B[a]P 為一種廣泛存在於環境中的 PAHs 類致癌物質。我們分析了 B[a]P 對於 H1299, H1355, H23, CH27, Calu-1, H226 及 CL3 等肺癌細胞株之細胞週期影響，發現 B[a]P 會非常明顯地分別造成 H1355 細胞的 S 期細胞週期停滯及 CL3 細胞的 G2/M 期細胞週期停滯。當細胞受到了傷害，卻無法進入由 p53 所主導 G1 期的細胞週期停滯時，便累積在細胞週期的 S 期，然而這些帶有受傷的細胞在細胞複製時則有可能將突變帶入子細胞中。在此，我們為證實 B[a]P 造成 p53 突變細胞的 S 期細胞週期停滯之機制，我們利用西方點墨法分析一些細胞週期調控蛋白，如 phospho-Chk1, Cdc2, Rb, p53, p21 及 PCNA 的表現，結果顯示以 1 μ M B[a]P 處理細胞只造成 Chk1 及 p53 的磷酸化，而其他蛋白的表現則無明顯的改變；然而先前研究報告指出，Chk1 的活化會使得細胞發生 S 期的細胞週期停滯。除此之外，我們也發現 B[a]P 會造成 ERK 及 p38 的活化，而 ERK 的活化及其轉位到核內將使得細胞之細胞週期由 G1 期進到 S 期。並且 p-ERK 的下游蛋白，c-Myc 也會因為 B[a]P 而活化。我們構築 EMSA 分析 H1355 細胞核內 c-Myc 與 E-box 的結合活性。結果顯示，B[a]P 所誘導的 Chk1 磷酸化及 S 期的細胞停滯，皆可以被 ERK 的抑制劑 (PD98059) 所抑制。根據以上結果，

B[a]P 所誘導的 S 期細胞週期停滯需要 ERK 的活化。

關鍵詞：B[a]P、Erk、c-myc

Abstract

PAHs, typified by the common pollutant B[a]P, are widespread and ubiquitous environmental pollutants with known carcinogenic properties. We have previously analyzed that B[a]P effect the cell cycle progression in lung cancer cell lines such as H1299, H1355, H23, CH27, Calu-1, H226 and CL3. B[a]P-induced cell cycle arrest in S-phase and G2/M phases of the cell cycle in H1355 and CL3 cells, respectively. When cells failed to undergo a p53-mediated cell cycle arrest in G1 phase, the cells were accumulated in the S phase with damaged DNA. It is suggested that may lead to replication of DNA on a damaged template resulting in the enhanced frequency of mutation in the daughter cell. Some cell cycle checkpoint such as phospho-Chk1, cdc2, Rb, p53, p21 and PCNA, were analyzed using Western blot. The checkpoint kinase p-Chk1, p-p53 and p21 were upregulated and the other phosphorylation proteins were not changed after treatment with 1 μ M of B[a]P for 24 hr. In present studies, B[a]P could also activate p38 and ERK. Activation of ERK promote the phosphorylated c-Myc to translocate into nucleus for the progression of G0/G1 to S phase. We performed an EMSA with nuclear extracts from

H1355 cells could bind with E-box containing c-Myc response element. B[a]P induced activation of Chk1 and S-phase arrest were abolished by ERK specific inhibitor (PD98059) treatment. Together, these results suggest that B[a]P inducing S-phase arrest may participate in the activation of ERK.

Keywords: B[a]P 、Erk 、c-myc

二、緣由與目的

PAH 是一種廣泛分布於環境中的污染物，通常是有機物不完全燃燒所致，其來源包括：發電廠石化燃料、焚化爐中廢棄物再高溫下燃燒、家用瓦斯熱水器、電鍍工廠及熔煉工廠等所排放之污染物 (Hazardous Substances Data Bank , 1988)。此外，香煙煙霧懸浮微粒、汽機車及飛機引擎所排放之廢棄物、烹調過程中食用油因加熱所產生的油煙也都含有 PAHs 類的化合物 8,9。PAHs 類的物質有許多，其中包括 benz[a]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene, benz[e]acephenanthrylene, benzo[k]fluoranthene 等，而 benzo[a]pyrene (B[a]P)，可以和細胞中的 cytochrome P-450 反應 15,16，進而代謝成一些 hydroxyl 或 epoxide 類的物質，而這些物質通常都具有很高的親電子性，以及可以和細胞內的大分子形成共價鍵結 19-21。香菸中可能的致癌物質 B [a] P 的代謝活

化過程，通常藉由 aryl hydrocarbon receptor (AhR)為一個 ligand-activated transcription factor，它可以和一些 planar aromatic compound 結合 6,7，而 B[a]P 及 TCDD 就是它的其中的 ligand。沒有和 ligand 結合的 AhR，在細胞質中是和 HSP90 形成 complex，且穩定存在於細胞質中。當 AhR 和 ligand 結合，AhR 就會進到細胞核中，且和 aryl hydrocarbon nuclear transporter protein (ARNT)形成 complex 7,13。此 complex 並結合至 xenobiotic response elements (XREs)，活化 P-450 1A1/1A2 和 P-450 1B1 等基因表現 13。B[a]P 不但可以和 AhR 結合，使 P-450 的表現增加，同時也是 P-450 的受質之一，經氧化作用而使本身代謝成高親電子性的物質，且可以和細胞內的 nucleic acid 和蛋白共價鍵結。B[a]P 經由 cytochrome P-450 1A1 (C Y P 1 A 1) 酵素系統代謝活化生成 (±)-trans-7,8-dihydroxy-9,10-dihydrobenzo(a)pyrene，然後再繼續氧化成最終代謝產物 anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene (BPDE)，BPDE 為 B[a]P 代謝後主要造成基因毒性的產物，它會去攻擊 DNA 的 guanine (N2 位置)以及 adenine 的 N6 位置 23,24，而形成鍵結，使 DNA 受到傷害，造成突變。B[a]P 另一個代謝路徑是單電子氧化 B[a]P 產生 radical cation，此產物會攻擊 DNA 的 dG 之 N7 位置，而形成 BPDE-N7-dG 鍵結物 26。且 B[a]P 也會被細胞代謝成 *ortho*-quinone。這些代謝路徑和形成的 DNA 鍵結物都在細胞及動物實驗中被證實。例如:人類白血球經處理 100 μ M 的 B[a]P，在外加酵素活化下，可產生 1.3 B[a]P adducts/ 10^8 nucleotides 1

1。在 1993 年，以導管直接將 B(a)P 灌入倉鼠的氣管中，結果發現倉鼠氣管會形成 B[a]P 的主要 DNA 鍵結物 BPDE-N2-dG 11,12。這些 DNA 鍵結物常會導致鹼基配對錯誤而造成基因突變。在 1994 年 Hecht 等學者在動物實驗證實 B[a]P (PAH 類) 為致癌物質，研究指出在小鼠體內注射 24 μ mole B[a]P 九週後，會誘導小鼠肝臟形成腫瘤 17；Fung 等在 1999 年利用 Salmonella typhimurium TA100 所進行的 Ames test 證實 B[a]P 具有致突變性 18，而在 1995 年 Cherpillod 的研究發現 B[a]P 會造成 p53 抑制基因之第 248 及 249 的 G \rightarrow T 的 transversion 22，且在 1996 年 Li 等人發現癌症病人的 neoplastic tissue 有較高的 benzo(a)pyrene (BP)-like DNA adduct 25，綜合以上結果證實 B[a]P 確實會引起人類和動物基因發生突變，進而導致人類癌症的發生。當 DNA 受傷時，會引發細胞的一些反應，如細胞週期停滯、細胞凋亡、以及腫瘤化。而這一些反應，都有其特殊的機制在調控著。B[a]P 是一個廣泛存在於環境且多報導指出為香煙中之其中一種重要的致癌物質，可以和細胞的 AhR 結合，接著轉錄活化 cytochrome P-450 的表現，而且 B[a]P 可以被 cytochrome P-450 代謝成 BPDE，BPDE 可以和細胞中的 DNA 形成鍵結，而使 DNA damage。B[a]P 對於肺癌細胞之影響，多以探討

DNA damage，關於 B[a]P 影響細胞 cell cycle 的變化，近來雖已有一些的研究結果，如：在 1997 年，Vaziri 等人，發現 B[a]P 會抑制由 PDGF 所誘發的 proliferation，而使得 SWISS 3T3 fibroblast cell 發生 G1 arrest，而此機制為 p53-independent，因為 B(a)P 也會使 p53 -/- 的 3T3 cell 發生 cell cycle arrest 的現象 5。但在 2001 年發現 BPDE 會導致乳癌細胞 (MCF-7) 發生 S phase arrest 10,14，而且 BPDE 所引起的 S phase arrest 跟 chk1 的磷酸化有關 10，而且在 2002 年時，Hitt 等人，發現 BPDE 會活化 ERK 及 p38，而 BPDE 所造成的 S phase arrest，可以被 ERK 的抑制劑所抑制，所以顯示，ERK 的活化在 BPDE 所造成的 S phase 增加是必須的 3。但是尚未有探討到底 ERK 的活化和 chk1 以及 cell cycle 之間關聯的報告，以及 ERK 的活化，到底是活化了哪個蛋白而使細胞週期停滯，都需要進一步的探討。所以我們提出一大膽假設，ERK 是否是經由活化了它的下游蛋白 c-myc，再導致細胞的 S phase 的累積。已知 UV 或 IR 造成 ATM, ATR 等激酶活化而得知 p53 不同的磷酸化位置，並擬藉由 p53 的磷酸化情況初步推估 B[a]P 可啟動哪幾類激酶活化，並觀察 B(a)P 對於不同的細胞所產生的細胞週期反應，以及一些和細胞週期有關的蛋白的表現，及 c-myc 的活化現象，以期能更了解 B(a)P 造成細胞週期停滯的機轉。

三、實驗方法與材料

1. 流式細胞分析：

首先將細胞分盤至 60 mm 培養皿中，

每個培養皿細胞數為 5×10^5 個，且培養液為 5 ml，靜置 37°C 培養箱 16 小時。之後將舊培養液移除，以 1×PBS 清洗兩次後，添加不同的抑制劑如 PD98059、U0126、SB203580、LY294002，處理時間為 1 hr，接著各別加入不同濃度的 BPDE 0.1 μ M 和 B[a]P 1 μ M 於細胞內作用。處理時間到後收細胞，步驟如下：將舊的培養液移至 15 ml 離心管中。用冰的 1×PBS 清洗兩次。用 1×Trypsin-EDTA 將細胞打下。在加入舊的培養液終止反應，移到 15 ml 離心管。離心 800 rpm 5 min，去上清液，再用冰的 1×PBS 清洗兩次。緩緩加入 1 ml 的 70 % cold ethanol 邊加邊搖，置於 4°C 中隔夜，以固定細胞。離心 800 rpm、5 分鐘，之後移除上清液。用冰的 1×PBS 清洗兩次，再移除上清液並盡量倒乾。PI stain，最後濃度為 Triton X-100 1% ，RNase A 0.5 mg / ml 和 PI 4 μ g/ml。靜置室溫 30 分鐘。用 40 μ m nylon mesh 過濾。上機 (流式細胞儀)。用 ModFit LT 軟體來分析資料。

2. 核質分離：

將含有細胞的 60 mm 培養皿，用冰的 1×PBS 洗二次，然後加 1ml 冰的 1×PBS，用 cell lifter 將細胞輕輕刮下，置入 1.5ml 的 eppendorf，離心 4°C 7000 轉 2min，去除上清液，加入 125 μ l 冰的 TD buffer (25mM Tris, pH8；2mM MgCl₂)，然後用 blue tip 將細胞沖散，冰上靜置 5min，加入 5 % NP-40 0.62 μ l，冰上靜置 2 min，此處理要避免超過 2 min 不然連核膜都會被打破，接著 4°C 2000 轉 5 min，將上清液吸到新的 1.5 ml eppendorf，加 10 μ l 100% glycerol，此管就是細胞質的蛋白萃取液，而 pellet 就加 60 μ l 冰的 BL buffer (10 mM Tris, pH8；0.4 M LiCl、20 % glycerol) vortex，靜置冰上 5 min，離心 4°C 13000 rpm 10 min，取上清液到新的 eppendorf，此管就是細胞核蛋白的萃取液，接著利用 Bio-Rad 測蛋白濃度。

3. EMSA：

取核質分離的核蛋白 10 μ g 加入，每管量為 20 μ g 室溫靜置 15 min 使蛋白和 probe 結合後移置冰上，每管加 5 μ l 的 loading buffer，load 到 6% native TBE gel，以 80 V 跑膠，6 % native TBE gel，先空跑，80V 90 min。

跑膠跑完後，取適當大小的 positive nylon membrane，先浸泡在 0.5×TBE buffer 中 5 ~ 10min，接著將膠和 membrane 疊在一起，在外圍再加各三張的 3M paper，membrane、膠及 3M paper 的貼合處都不能有氣泡，再利用濕式的 transfer tank (Hofer mini VE)，內注滿 0.5×TBE buffer，以 400 mA transfer 1hr，transfer 完後將 membrane 放到 UVC-515 ULTRAVIOLET MUTILINKER 照 1200 mJ 的 UV 二次，目的是將 probe 共價鍵結到 membrane 上，接著利用 Chemiluminescent EMSA Kit (Light Shift PIERCE) 的 wash buffer 洗一次 5min，blocking buffer blocking 15 min，接著加 HRP (用 blocking buffer 稀釋 1000 倍) 15 min，之後用 wash buffer 洗 4 次，每次 5min，接著加 equilibration buffer 5 min，然後先將 stable peroxide solution 和 luminol/enhancer solution 1ml：1ml 混合，此步驟以後要避光，接著加到 membrane 上使其發出螢光，接著在暗房進行自動顯影。

4. 西方點墨法：

(1) 製備細胞均質液：

實驗中處理過之 60mm dish 細胞以 PBS (0.8 % NaCl、0.02 % KCL、0.11 % Na₂HPO₄) 清洗二次，再以 1×SDS gel-loading buffer (100 mM Tris pH6.8、4 % SDS、20 % Glycerol、1.43 M 2-mercaptoethanol 及一點 bromophenol blue) 200 μ l，將細胞溶解掉，接著利用 SONIFIER 250 打超音波 10 sec 設定的條件

為 Duty cycle 30 %、Out put 3，將細胞的 DNA 打斷，這樣可以減少 sample 的黏稠度，再以 Digital Dry Bath (GENEPURE TECHNOLOGY) 100°C 5 min denature 蛋白。製備 12.5% SDS PAGE，將製備好的膠先用 1X Tris-glycine running buffer 小心填滿膠以蓋過 well 為原則，之後將 sample，以 95 °C 加熱 5 分鐘(目的使蛋白變性)，再立即放入冰上冷卻，避免蛋白結構再度恢復。每 well load 20 μ l 的蛋白萃取液，先以 70 伏特電壓分析電泳 20 分鐘使樣品能堆積到上下膠交接處即距膠片頂端 3 公分處，再改以 100 伏特分析電泳 2 小時。在電泳分析完畢前 10 分鐘，先準備一張大小相當的 Hybond P membrane，須用甲醇浸潤一下約 15 秒，再改以二次水清洗 10 分鐘。將分析完畢的電泳片小心取下，同時在電泳片的上下各平鋪上 3 張的 3M 濾紙，一起浸泡在 transfer buffer 【30 ml methanol, 2.25 g Glycine、2.5 ml 的 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 加二次水到 150ml】中約 1 分鐘，利用半乾式轉漬器：Hoefer Semiphor Transfer 以半乾式轉漬法在電源供應器：Pharmacia Biotech power supply EPS301 以 150mA 電壓的條件下進行 50 分鐘，使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到 Hybond P membrane。將 transfer 好的 Hybond P membrane 浸泡在含有 5 % 脫脂奶粉的 1X TTBS buffer 【50 mM Tris, 0.2 % Tween 20, 150 mM NaCl, pH 7.5】中，於室溫下 shaking 1 小時，進行 blocking。

(2) 抗體作用及偵測方法：

將已 blocking 完成的 PVDF membrane 分別加入專一性的一級抗體。與 2 % 脫脂奶粉的 1X TTBS buffer，於 4°C 下 shaking 一個晚上。隔天取出 membrane 以 2 % 脫脂奶粉的 1X TTBS buffer 在室溫下清洗 2 次，每次 10 分鐘，每次 100ml 再用 1X TTBS buffer 在相同條件下室溫清洗 2 次，每次 10 分鐘，每次 100ml 用量。一次抗體可以回收再用，須加入 2 % 的 sodium azide 作為防腐劑，以 1:100 比例使用。再用含：anti-rabbit IgG-HRP 二級抗體以 2 % 脫脂奶粉的 1X TTBS buffer 以 5000 倍稀釋，於室溫下震盪一小時，重覆清洗步驟後以 1X PBS 潤濕 5 分鐘準備壓片。

5. Adenovirus infection

(1) Adenovirus 的 amplifying

Adenovirus WT Chk1 及 dominant Chk1 由 Vaziri 提供，virus 之 amplifying 步驟如下，以 5% FBS-MEM medium 培養 293T cell 於 75T flask，約 6 成滿時，將就 medium 去除，接著加入 5ml 含有 Adenovirus 的 medium，37°C 培養，當有 50% 細胞浮起時，用舊 medium 將細胞沖起置入 15 ml 離心管，離 1500 rpm 去上清液，加入 0.5ml 之 1xPBS，冷凍解凍三次將細胞打破，將細胞碎片離下，取上清液至 eppendroff，-20°C 儲存。

(2) Adenovirus 之 infection

將 H1355 細胞以 5×10^5 cells/dish 分盤至 60 mm dish，16 小時後，去掉舊 medium，加入含有 Ad WT Chk1 或 Ad K \rightarrow R Chk1 之 1 ml medium，37°C 培養 4 小時後，加入 4 ml 5% FBS-RPMI 1640 medium，37°C 培養 20 小時後分兩部分，一部分以 SDS sample buffer 溶解細胞，超音波打 5 sec 後隔 10 分鐘再打 5 sec，以 95 °C denature 5 min，以 western blot 之方式偵測 Chk1 之表現。另一方面，去除舊 medium 之後加 1 μ M B[a]P 24 hr 後以 -20°C 75% 酒精固定細胞，4°C 靜置一晚，以 PI 染色後，以 flow cytometry 偵測其細胞週期分布狀況。

四、實驗結果

一、多環芳香烴類 B[a]P 對不同肺癌細胞株細胞週期之分析

已知細胞受到傷害的時候，細胞會有一些反應，像是細胞週期停滯，細胞凋亡等現象，而之前的研究顯示 B[a]P 可以經由細胞的代謝，將其代謝成為有基因毒性的物質，而且 B[a]P 又和肺癌有密不可分的關聯，所以我們想要了解 B[a]P 處理不同的肺癌細胞株，如 Calu-1, H1299, H23, H226, CL3, CH27 及 H1355 等，對於細胞

週期是否有影響。結果顯示以 $10\ \mu\text{M}$ B[a]P 處理 Calu-1, H1299, H226 這三株細胞株 48 小時後，發現細胞週期的分布並不會有明顯之影響 (圖一)。

B[a]P 活化 H1355 細胞株之 P53

而以不同濃度 B[a]P 處理 H1355，24 小時發現，B[a]P 會造成 P53 之 Ser15, 37, 20, 392 等位置的磷酸化增加 (圖二)，但不影響 P53 的表現，而且也會活化 P21 及 BAX 等蛋白的表現，但是 P21 的表現量在 6 小時達到高峰，和 P53 的活化時間點有些許差異，而 BAX 的表現及 P53 的活化就有一致，或許 B[a]P 所造成的 sub-G1 增加，和 BAX 蛋白的增加可能有關聯。

B[a]P 及 BPDE 造成 H1355 細胞 MAPK 之活化：

許多訊息傳遞及細胞反應是經由 MAPK pathway 來完成的，因此為了證實 B[a]P 所造成之 S phase arrest 是否與 MAPK 之活化有關，所以利用西方墨點法來觀察 B[a]P 是否會活化 MAPK pathway，結果顯示，以 $1\ \mu\text{M}$ B[a]P 處理細胞在 3 小時及 24 小時後觀察到 pERK 的增加，以及在 24、48 小時 p-P38 也有增加的現象 (圖三 a)；另外，B[a]P 的代謝產物 BPDE 也會造成 ERK 及 P38 之磷酸化 (圖三 b)，且 BPDE 所造成的 ERK 及 P38 之磷酸化現象比起 B[a]P 要來的快，當以 $0.1\ \mu\text{M}$ BPDE 處理細胞 20 分鐘後 ERK 及 P38 之磷酸化達最高峰 (圖三 b)，而如果以 $1\ \mu\text{M}$ B[a]P 處理 H1355 細胞，ERK 的活化要在 3 個小時以後才會出現。

B[a]P 造成 ERK 的下游蛋白 C-Myc 的活化：

c-Myc 為 ERK 的下游蛋白，而且會轉錄活化一些 S phase protein，使細胞由 G1 phase 進入 S phase，所以為了了解 B[a]P 及 BPDE 所造成的 S phase arrest 是否是經由活化 ERK，接著再活化 c-Myc 所造成的，因此利用西方墨點法以及 EMSA 來觀察 B[a]P 對於 c-Myc 活化的情形，結果發現，以 $1\ \mu\text{M}$ B[a]P 處理細胞 3 小時後，會促進 c-Myc 結合到 E-box 的位置，進而增加 S phase 的累積 (圖四 a)，而以 $0.1\ \mu\text{M}$ BPDE 處理細胞 20 分鐘，其 c-Myc 的磷酸化達到高峰 (圖三 b)，因此，不論以 B[a]P 或 BPDE 處理 H1355 細胞，都會促進 c-Myc 的磷酸化，而且此磷酸化的時間點與 ERK 磷酸化的時間點相符；而另外 Myc 會結合到 E-box 的 response element，以 EMSA 的方式來偵測 c-Myc 的活性也顯示 B[a]P 及 BPDE 會促進 c-Myc 與 E-box 的結合能力 (圖四 a, b)，如果先行處理 ERK 的抑制劑 PD98059 $25\ \mu\text{M}$ ，會使得 c-Myc 與 E-box 的結合能力降低 (圖四 a)。綜合以上結果顯示，B[a]P 及 BPDE 可能經由活化 ERK，再活化 c-Myc。

B(a)P 所造成的 S phase arrest 是經由 ERK 的活化

B(a)P 所造成的 S phase arrest 需要透過 ERK 的活化，為了更加確定此一論點，因此利用另外一種 ERK 抑制劑 PD98059 來重複實驗，以確定 S phase arrest 與 ERK 之關係，實驗結果顯示，單獨處理 PD98059 即使高達 $25\ \mu\text{M}$ 並不會影響細胞的細胞週期，且隨著處理 PD98059 濃度的上升，其抑制由 B[a]P 所造成的 S phase arrest 的現象也隨著增加，由原本的 60.54% S phase 下降至 35.3% S phase (圖五)，當 ERK 的活化被抑制了，其 S phase 的累積情形也減

少，因此得知，由 B[a]P 所造成的 S phase arrest 需要透過活化 ERK。

在 1998 年，Reiners 等人，發現 PD98059 為 AhR 之 Antagonist，其可以抑制 AhR 接到 DRE sequence，使其無法轉錄活化 CYP1A1 及 CYP1B1 等蛋白 4，所以我們以 PD98059 的抑制劑去抑制 B[a]P 所造成的 S phase arrest，發現可以抑制 S phase arrest，可能原因為 PD98059 抑制了 AhR 的活性，而使得其下游基因 CYP1A1 無法轉錄活化，所以 B[a]P 無法被代謝成 BPDE 造成 S phase arrest，而 BPDE 會導致細胞 S phase arrest，其無需經過代謝之作用，所以 PD98059 並無法抑制 BPDE 所造成的 S phase arrest。處理 PD98059，可以抑制掉 B[a]P 所誘發之 Chk1 的磷酸化 (圖六)，可能也是因為 PD98059 為 AhR 之 Antagonist，所以 B[a]P 無法代謝成 BPDE，而 B[a]P 需要代謝成 BPDE 才有方法磷酸化 Chk1，所以 PD98059 會抑制 B[a]P 誘發的磷酸化 Chk1 (圖六)。

B[a]P 活化 Chk1 需要透過 ERK 的活化：

已知處理 B[a]P 會造成 H1355 細胞之 Chk1 活化 (圖六)，而 Chk1 和 S 期的細胞週期停滯有關係，且當細胞處理 ERK 之抑制劑會阻斷 B[a]P 造成的 S 期細胞停滯，所以假設 B[a]P 需透過 ERK 的活化，再去活化 Chk1，然後才造成細胞週期停滯，為了證實此點理論，我們利用 ERK 之專一抑制劑 PD98059 先處理 H1355 細胞，接著一起處理 1 μ M B[a]P，24 小時後，以 western blot 觀察 p-Chk1 之表現。結果發現，B[a]P 會造成 ERK 及 Chk1 的磷酸化，而添加了 PD98059 會抑制 ERK 的磷酸化，而且也會抑制掉 Chk1 的磷酸化 (圖六)，所以 Chk1 的活化可能需要透過 ERK 的活化。

而當細胞大量表現 WT Chk1 時，並不會造成 ERK 的磷酸化 (圖七)，所以證實 Chk1 不會去磷酸 ERK。

B[a]P 造成 S phase arrest 與 Chk1 參與的關係

在之前發現 H1355 細胞處理 B[a]P 後，會使 Chk1 活化，所以我們想了解 Chk1 在 B(a)P 造成 H1355 的 S phase arrest 是否是必須的。所以我們利用 adenovirus 載體，使細胞表現 kinase-inactive mutant 的 Chk1，也就是 Chk1 K \rightarrow R，而且此 mutant form 的 Chk1 有 dominant negative 的效果。首先將細胞分盤，16 小時後，以 50, 500, 5000 倍的稀釋倍率，稀釋 AdChk1 及 AdChk1 K \rightarrow R，接著感染細胞使細胞表現 Chk1 及 Chk1 K \rightarrow R，37 $^{\circ}$ C 培養 20 小時後，再處理 1 μ M B[a]P 24 小時後收細胞，進行 flow cytometry。結果發現，隨著感染的病毒量的增加，會使的 H1355 細胞 Chk1 及 Chk1 K \rightarrow R 的表現也隨之增加 (圖六 b)。當 wild type 的 Chk1 表現量漸漸增加，會使的 H1355 細胞的 G2/M phase 也漸漸的增加，由原本 control 的 15% G2/M phase，增加到 44.65% G2/M phase，這個結果顯示大量表現 wild type Chk1 會使的細胞發生 S 及 G2/M phase arrest，但是大量表現 dominant negative Chk1 K \rightarrow R，卻不會影響細胞的週期。在有處理 B[a]P 方面，跟之前的結果一樣，處理 1 μ M B[a]P 24 小時後，細胞會發生 S phase arrest，由 16.88%，增加到 46.69%，但是使細胞表現 dominant negative Chk1 K \rightarrow R，雖然不會降低 S phase arrest 的比例，但是 G2/M 比例提高，表示 cell cycle 不 arrest 在 S phase 會繼續進行到 G2/M。這個結果意味著 B[a]P 所造成 H1355

細胞株的 S phase arrest 或許是經由 Chk1 的活化來達成。

討論

雖然 B[a]P 所造成的 S phase arrest 為 P53-independent，但是我們想藉由觀察 B[a]P 促使 P53 磷酸化在不同的位置，進而了解 B[a]P 活化了哪些激酶，磷酸化 P53 在 Ser6 及 Ser9 位置之上游蛋白為 CK1 δ/ϵ ，Ser15 為 ATR、DNA-PK、ATM、P38 等，Ser392 為 CAK。結果顯示處理 B[a]P 會造成 P53 磷酸化於 Ser15, Ser20, Ser37 及 Ser392 等地方，而值得注意的是 Ser20 的磷酸化，因為負責磷酸化此位置的 Chk1 及 Chk2 和 S 及 G2/M 的 cell cycle checkpoints 有關。而 Ser15 之大量磷酸化，可能是因為，B[a]P 代謝後活化了 ATM 及 ATR 這兩個蛋白之結果。已知以 B[a]P 處理 H1355 細胞會造成細胞週期停滯於 S phase，為了更進一步的了解此一現象機轉，所以我們分析了一些 cell cycle checkpoints protein，如 pRb, PCNA, p-Cdc2 (Tyr15), Chk1 及 Chk2 等蛋白，結果發現以 B[a]P 處理 H1355 細胞會大量的誘導出 Chk1 的磷酸化 (data not shown)，且在 2003 年，Sorensen 等人，發現在 IR 誘發的 S phase checkpoint，為 IR 活化 ATM 後，會再進一步活化 Chk1 及 Chk2，接著 Chk1 及 Chk2 一起磷酸化 Cdc25A，使的 Cdc25A 迅速的被分解掉，接著使 Cdk2 的活性下降，然後使的細胞發生 S phase arrest 2，所以顯示 Chk1 的活化和細胞的 S phase checkpoint 有關聯，而且在 2002 年，Guo 等人，發現 BPDE 造成 H1299 細胞株的 S phase arrest 是透過活化 Chk1 來達成的¹⁰，此二篇報導之結果暗示了，BPDE 為透過活化 Chk1 而使的 Cdc25A 快速的降解，然後使細胞週

期停滯在 S phase。

在 2002 年時，Hitt 等人，發現 BPDE 會活化 ERK 及 p38，且 BPDE 所造成的 S phase arrest，可以被 ERK 的抑制劑所抑制，所以顯示，ERK 的活化在 BPDE 所造成的 S phase 增加是必須的³，我們的研究結果也發現，以 B[a]P 處理 H1355 細胞株，會活化 ERK 以及 P38 (圖三)，但是到目前為止，尚未有報導指出 B[a]P 所活化的 ERK 及 Chk1 之間的關係，在圖五我們發現，以 ERK 的抑制劑 PD98059 處理 H1355，接著再處理 B[a]P，以 western blot 觀察其 p-Chk1 的表現情形，結果發現有處理 PD98059 的，其 p-Chk1 沒有被 B[a]P 所誘導出來，所以 ERK 在這裡可能扮演著活化 Chk1 的角色，但是在 1998 年，Reiners 等人，發現 PD98059 為 AhR 之 Antagonist，其可以抑制 AhR 接到 DRE sequence，使其無法轉錄活化 CYP1A1 及 CYP1B1 等蛋白⁴，所以我們以 PD98059 的抑制劑去抑制 ERK 的磷酸化，發現會使 Chk1 的磷酸化降低，另一個可能原因為 PD98059 抑制了 AhR 的活性，而使得其下游基因 CYP1A1 無法轉錄活化，所以 B[a]P 無法被代謝成 BPDE，而且 BPDE 會導致 Chk1 的磷酸化，所以 PD98059 可能是抑制了 B[a]P 代謝成 BPDE 而使的 Chk1 沒有被磷酸化，而不是 ERK 為其上游蛋白。

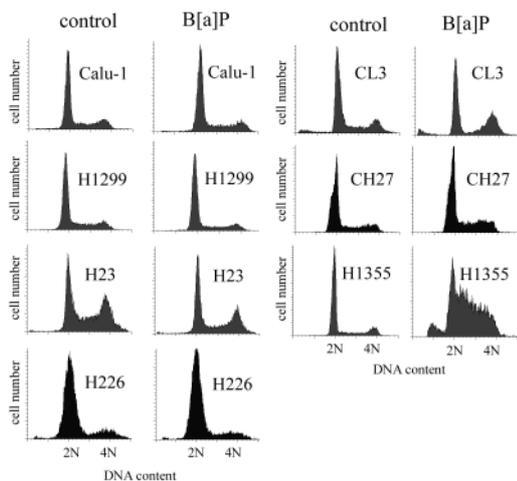
為了證實，在 B[a]P 所造成的 S phase arrest 是透過 Chk1 的活化，所以利用 Adenovirus 使細胞表現 Chk1 的 dominant negative protein，但是在我們的結果卻發現 Chk1 的 dominant negative protein，雖無法抑制 B[a]P 所誘導的 S phase arrest 的比例，但其實已有 G2/M 累積，表示 S phase 累積現象可能已被破壞，

此結果的原因可能是由於 dominant negative Chk 表現量還不夠抑制正常的 Chk1，又或許是處理 B[a]P 需要超過 24 小時才會看到 H1355 的 S phase arrest，所以作用的時間太久而使的 dominant negative Chk 的表現量下降，而無法抑制掉正常的 Chk1，如以 Adenovirus 使細胞大量表現 wild type Chk1，細胞週期將會 arrest 在 S 及 G2/M phase，顯示 Chk1 在 S phase 及 G2/M checkpoints 之重要性。

參考文獻

1. Roggeband R, Wolterbeek AP, Rutten AA, Baan RA. Comparative 32P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene--DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes. *Carcinogenesis* 1993;14(9):1945-50.
2. Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK, et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 2003;3(3):247-58.
3. Patten Hitt E, DeLong MJ, Merrill AH, Jr. Benzo(a)pyrene activates extracellular signal-related and p38 mitogen-activated protein kinases in HT29 colon adenocarcinoma cells: involvement in NAD(P)H:quinone reductase activity and cell proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;183(3):160-7.
4. Reiners JJ, Jr., Lee JY, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP. PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharmacol* 1998;53(3):438-45.
5. Vaziri C, Faller DV. A benzo[a]pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53-independent G1 arrest in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1997;272(5):2762-9.
6. Landers JP, Bunce NJ. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem J* 1991;276 (Pt 2):273-87.
7. Whitlock JP, Jr. Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:251-77.
8. Kim YJ, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction *Cancer* 1997;33(5):787-91.
10. Chiang TA, Wu PF, Ko YC. Identification of carcinogens in cooking oil fumes. *Environ Res* 1999;81(1):18-22.
11. Li S, Pan D, Wang G. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes. *Arch Environ Health* 1994;49(2):119-22.
12. Guo N, Faller DV, Vaziri C. Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive. *Cell Growth Differ* 2002;13(2):77-86.
13. Wolterbeek AP, Roggeband R, Steenwinkel MJ, Baan RA, Rutten AA. Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by 32P-postlabeling analysis and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis* 1993;14(3):463-7.
14. Roggeband R, Wolterbeek AP, Melis OW, Wittekoek ME, Rutten AA, Feron VJ, et al. DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogenesis* 1994;15(4):661-5.
15. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991;252(5008):954-8.
16. Khan QA, Anderson LM. Hydrocarbon carcinogens evade cellular defense mechanism of G1 arrest in nontransformed and malignant lung cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;173(2):105-13.
17. Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 1982;42(12):4875-917.
18. Denison MS, Whitlock JP, Jr. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem* 1995;270(31):18175-8.

19. Hecht SS, Isaacs S, Trushin N. Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene: a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1994;15(12):2721-5.
20. Fung J, Thomas PE, Iba MM. Cytochrome P450 1A1 in rat peripheral blood lymphocytes: inducibility in vivo and bioactivation of benzo[a]pyrene in the Salmonella typhimurium mutagenicity assay in vitro. *Mutat Res* 1999;438(1):1-12.
21. Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 1995;16(3):437-41.
22. Hemminki K. DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis* 1993;14(10):2007-12.
23. Loechler EL. How are potent bulky carcinogens able to induce such a diverse array of mutations? *Mol Carcinog* 1995;13(4):213-9.
24. Cherpillod P, Amstad PA. Benzo[a]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Mol Carcinog* 1995;13(1):15-20.
25. Cheng SC, Hilton BD, Roman JM, Dipple A. DNA adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide. *Chem Res Toxicol* 1989;2(5):334-40.
26. Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 2001;22(12):1903-30.
27. Li D, Wang M, Dhingra K, Hittelman WN. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer Res* 1996;56(2):287-93.
28. Cavalieri EL, Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol Ther* 1992;55(2):183-99.



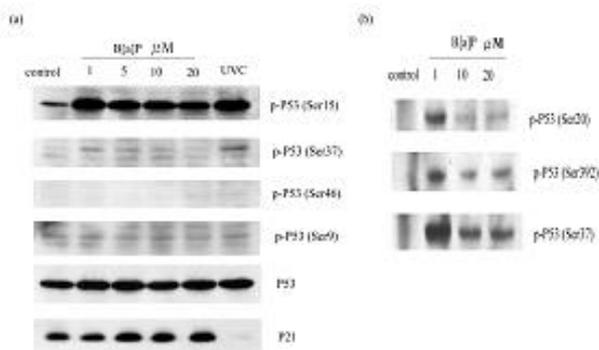
(1)

	Calu-1		H1299		H23		H226	
B[a]P(μ M)	0	10	0	10	0	10	0	10
G1 (%)	61.07	61.78	61.72	69.19	31.41	43.63	77.93	78.52
S (%)	27.58	28.2	30.58	23.12	43.5	32.52	10.5	14.46
G2/M (%)	11.35	10.02	7.43	7.69	25.09	23.85	11.57	7.02

(2) continue

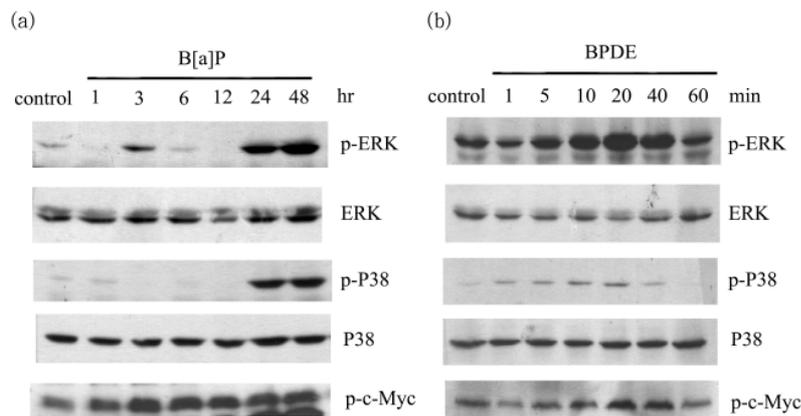
	CL3		CH27		H1355	
B[a]P(μ M)	0	10	0	10	0	10
G1 (%)	57.68	51.54	66.06	54.69	70.88	22.02
S (%)	29.71	15.83	22.27	32.85	18.21	77.98
G2/M (%)	12.61	32.63	11.68	12.46	10.91	0

圖一、多環芳香烴類 B[a]P 對不同肺癌細胞株細胞週期之分析 將細胞株 Calu-1, H1299, H23, H226, CL3, CH27 及 H1355 分盤至 60mm dish 中，每盤細胞數為 5×10^5 個，培養 16 小時後，再以 10μ M B(a)P 處理細胞 48 小時後收細胞，以 flow cytometry 進行 PI 染色分析(a)，及其各 phase (%)統計表(b)。



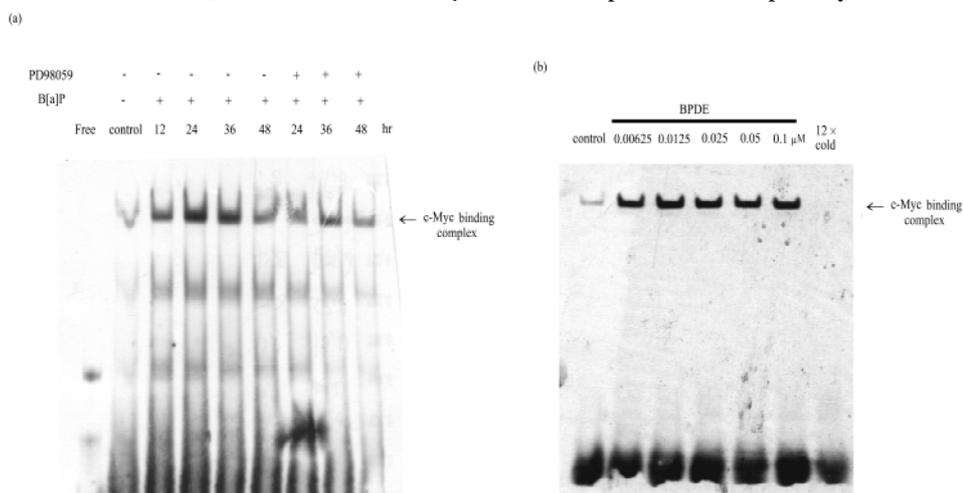
圖二、B[a]P 促進 P53 磷酸化在不同的位置

將 H1355 細胞以 5×10^5 cells/dish 分盤至 60 mm di 後，處理 1, 5, 10, 20 μ M B[a]P 或 30 mJ UVC，24 小 時，以 western blot 觀察 P53 Ser15, 37, 46, 9 之磷酸化現 象。處理 1, 10, 20 μ M B[a]P，24 小時後收細胞，以 weste 觀察 P53 Ser20, 392, 37 之磷酸化現象 (b)。



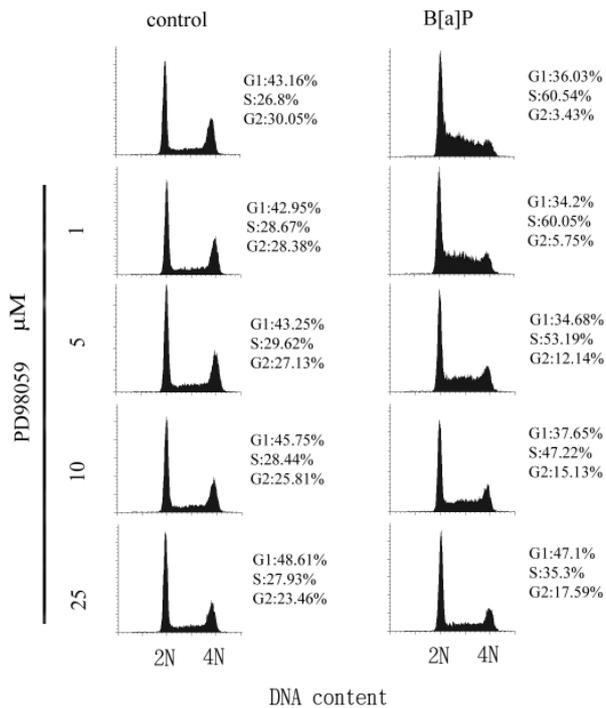
圖三、處理 B(a)P 及 BPDE，活化 ERK 及 p38

將 H1355 細胞以 1×10^6 cells/dish 分盤至 60mm dish，16 小時後加入 $1 \mu\text{M}$ B(a)P (a) 或 $0.1 \mu\text{M}$ BPDE (b)，分別處理 1, 3, 6, 12, 24, 48 小時及 1, 5, 10, 20, 40, 60 分鐘，收細胞以 western blot 觀察 p-ERK, ERK, p-P38, P38 及 p-C-myc 的表現。



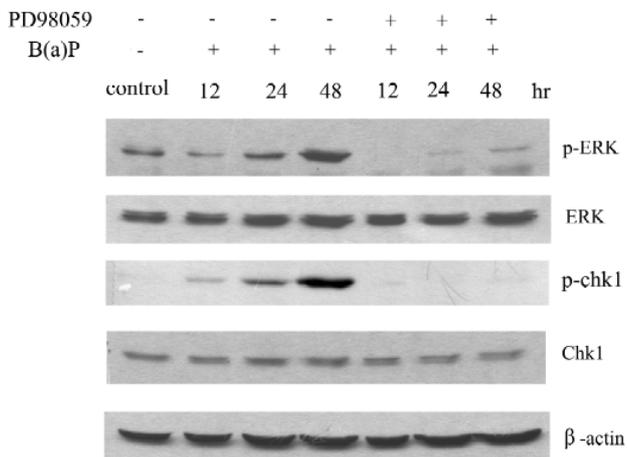
圖四、B(a)P、BPDE 活化 C-myc 和 E-box 的結合能力

將 H1355 細胞以 5×10^5 cells/dish 分盤至 60mm dish，16 小時後，有或無處理 $25 \mu\text{M}$ PD98059 1 小時後，再一起處理 $1 \mu\text{M}$ B[a]P，12, 24, 36, 48 小時後，以核質分離的方式收細胞，接著以核蛋白，用 EMSA 法觀察 c-Myc 的活性(a)。或處理 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 μM BPDE，40 分鐘後收細胞，接著以核蛋白，用 EMSA 法觀察 c-Myc 的活性(b)。



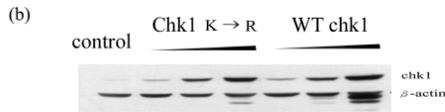
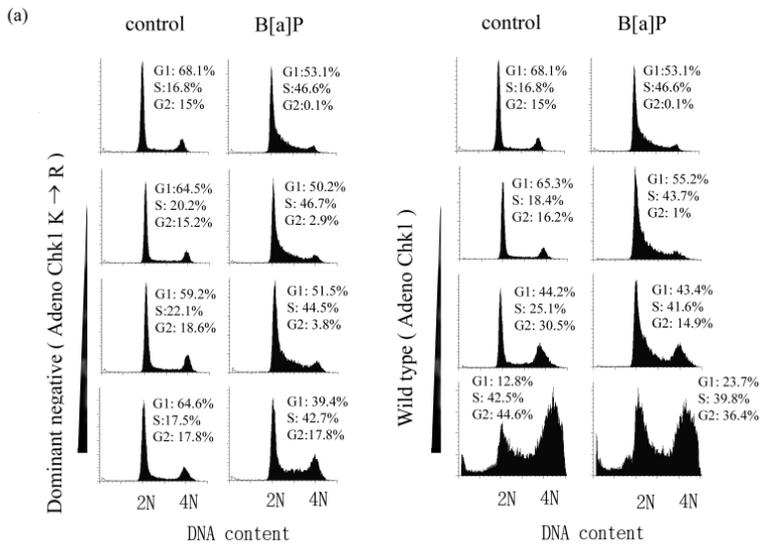
圖五、處理 PD98059 抑制劑，B(a)P 所造成 S phase arrest 之影響

將 H1355 細胞以 5×10^5 cells/dish 分盤至 60mm dish，16 小時後，先處理 1, 5, 10, 25 μ M PD98059 1 小時後，再一起加 1 μ M B(a)P，24 小時後收細胞，以 flow cytometry 進行 PI 染色分析。



圖六、B[a]P 造成的磷酸化 Chk1 需透過 ERK 之活化

將 H1355 細胞以 1×10^6 cells/dish 分盤至 60mm dish，16 小時後，處理 25 μ M PD98059 1 小時，再一起處理 1 μ M B[a]P，12, 24, 48 小時後收細胞以 western blot 來觀察 p-Chk1 及 p-ERK。



圖七、Adenovirus Chk1 及 dominant negative Chk1 的 infection，B(a)P 造成的 S phase arrest 之影響

將 H1355 細胞以 5×10^5 cells/dish 分盤至 60mm dish，16 小時後，感染病毒，24 小時後，處理 $1 \mu\text{M}$ B(a)P，24 小時後收細胞，以 flow cytometry 進行 PI 染色分析(a)。及其表現 chk1 K→R 及 WT chk1 和磷酸化 ERK 之 western (b)。