

苯巴比妥(PB), 丁基羥基甲氧苯(BHA)與二丁基羥基 甲苯(BHT)促進已起源作用之大鼠肝臟上皮細胞 (INITIATED RAT EPITHELIAL CELL) 之轉化(TRANSFORMATION)研究

曾信雄 *黃文鴻

行政院衛生署藥物食品檢驗局

*陽明大學 衛生福利研究所

摘 要

新生之大鼠(wistar), 以2-乙醯胺基芴(2-acetylaminofluorene; 2-AAF)於生體內(*in vivo*)進行腫瘤起源作用(initiation), 一星期後, 肝臟經胰蛋白消化作用(trypsinization), 後取得肝臟上皮細胞(liver epithelial cell), 再進行生體外(*in vitro*)之促進作用(promotion)以測定苯巴比妥(PB), 丁基羥基甲氧苯(BHA)與二丁基羥基甲苯(BHT)等之促進細胞轉化之活性。經起源作用之肝臟上皮細胞若於約20星期內未加以腫瘤促進作用之處理, 則細胞可維持在不轉化(untransformation)之狀態。經生體內-生體外(*in vivo-in vitro*)模式之研究結果, 該三種物質在特定之濃度下不但明顯地影響已經起源之細胞生長與增殖活性(proliferative activity)亦明顯誘導肝臟上皮細胞轉化與惡性腫瘤(malignant tumor)標誌之 γ -麩醯基轉胺酶(γ -glutamyltranspeptidase), 表面生長因子之鍵合(epidermal growth factor binding)及DNA量之增加, 這些活性均出現明顯之劑量-反應關係(dose-response manner)。

前 言

誘發癌症之環境因子之種類甚多, 它包括日常生活中常接觸與使用之許多化學物質如農藥, 工業化學物質, 食品添加物與污染物等, 這些外源物質(xenobiotics)於人體中之致癌效應, 常受到其致癌能力, 接觸時間, 接受劑量與途徑, 生體內之生物轉化(biotransformation)活性及其致毒機轉之影響而異, 事實上化學物質之致癌機轉往往表現在至少二個時期之效應上⁽¹⁾, 其一是致癌機轉可能係由單一外源物質之影響而導致細胞內基因組(genome)之永久變異或可改變其他遺傳形質之基因毒性

(genotoxicity)誘導之起源作用(initiation), 其二是外源物質之連續長期接觸或另外具有促進作用(promotion)之他種外源物質之攝入而刺激已起源作用之細胞表現型(phenotype)之轉變, 並且誘發了細胞之選擇性增殖(selective proliferation)與腫瘤發育(growth of tumor), 誘發腫瘤之起源作用或促進作用之物質分別稱為起源物質(initiator)與促進物質(promoter), 後者可導致已起源作用之目標組織或器官之表現型改變(epigenetic)直至腫瘤發生, 惟其效應往往可能同時受到劑量及授予頻率之直接影響, 惟一旦授予條件消失時亦可能出現回復之可逆性質(reversibility)⁽²⁾。腫瘤促進活性之研究模式一般以試驗動物之生體內試驗為主, 如大鼠

之皮膚試驗模式。甚至研究肝臟癌瘤之促進作用也選用類似之模式。肝臟係外源物質進入體內後之首先到達與進行生物轉化之首要場所,因此該物質之活化(activation)致使毒性增加或不活化(inactivation)而成無毒性等效應均在此進行。

1971年peraino⁽³⁾以2-乙醯胺基芴(2-AAF)及苯巴比妥(PB)分別用作致癌實驗時之起源物質及促進物質,1976年Solt與Faber⁽⁴⁾利用包括腫瘤起源作用,選擇作用與促進作用三階段之模式選用2-乙醯胺基芴(2-AAF)以及四氯甲烷(CCl₄)為實驗物質,而且為了影響細胞對毒性之抗性選擇與選擇性增殖特性,研究中也使用部份肝臟切除術(hepatectomy),由於此實驗系統極為複雜,因此自實驗開始至腫瘤誘發時止歷經約9個月之久,因此可知若僅以生體內之模式進行實驗,似乎無法於短時間內獲知結果,亦無法得知腫瘤促進物質誘發腫瘤發生之確切機轉。

影響腫瘤促進作用機轉之重要因素,可能是腫瘤促進物質改變細胞內膜之功能,如擔任細胞間小分子物質轉移,運輸與連接性之抑制作用⁽⁵⁾,亦可能如研究巴豆油(croton)中活性物質,12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)時之蛋白質激酶C (protein kinase C)之活化效應⁽⁶⁾,或者某些特定之基因與致癌基因(oncogene)之特性可能因受到腫瘤促進物質之影響而致其活性之調整等^(7,8)。以生體內-生體外(*in vivo-in vitro*)混合模式研究腫瘤促進作用,不但可以獲得生體內某些特有之條件與藉生體外之細胞培養模式瞭解腫瘤促進作用之機轉,而且亦可充分達到測定腫瘤促進作用之快速與正確性。1980年Kitagawa等⁽⁹⁾曾以新生之大鼠注射AAF來促使起源作用之發生,後藉分離之肝臟上皮細胞(epithelial cell)以不同濃度之物質以生體外授予模式進行腫瘤之促進效應實驗,並進一步藉此實驗來確定誘導作用之遲延性,可逆性,起源步驟,蛋白質合成與先驅物質之鍵入關係等,並且觀察腫瘤促進物質之反應機轉,細胞骨架(cytoskeleton)與細胞外基質(extracellular matrix)成長行為之改變與細胞著床活性之變更情形⁽¹⁰⁾等。

丁基羥基甲氧苯(BHA)與二丁基羥基甲苯(BHT)屬於酚態抗氧化劑(phenolic antioxidant),均為食品添加物,於食品中不但有抑制微生物生長或產毒之效應,而且亦具有抑制食品中不飽和脂肪酸結構之自動氧化作用(autooxidation)以避免不飽和脂肪酸之酸敗與酮類或醛類化合物之產生而引發不愉快之味道,甚至影響脂溶性維生素A與E等物質之變性而導致食品中營養品質之變化以及

氧化後產生具有毒性之過氧化物影響食品品質之衛生與安全。事實上應用於人類食品中出現之毒性效應或其毒理已有很多之研究,且其中有不少結果顯示對動物之安全性實應注意與需再進一步加以評估。BHA與BHT亦與許多腫瘤促進物質相同,它對於腫瘤之促進作用,可能由於起源物質種類之不同與目標器官之差異而出現反應之特異性。若以生體內之模式進行BHA與BHT之毒性評估可發現它對齧齒類動物之組織或多種器官具有腫瘤之促進作用⁽¹¹⁾,授予2-AAF經一段時間後BHT確有加強肝臟腫瘤產生之效應⁽¹²⁾,若以亞硝基二甲胺(nitrosodimethylamine)授予B₆C₃F₁小鼠,俟細胞增生之肝臟(neoplastic liver)受到傷害後,再以口授方式授予BHA則傷害作用會顯著增加⁽¹³⁾,1986年Preat等⁽¹⁴⁾,以Solt與Faber於1976年發表之研究模式觀察以亞硝基二甲胺為起源物質時BHT雖可誘導 γ -GT之活性增加,但似乎並未發展成肝癌,同年Ito等⁽¹¹⁾對BHT是否對Fichers大鼠亦具腫瘤促進之效應而進行系統之研究,最後他指出經亞硝胺(nitrosamine)起源作用後,BHT是膀胱與甲狀腺腫瘤之促進物質但對胃、腸、肝臟與乳腺似乎並無作用,另BHA與BHT於致癌物質授予之前或同時授予時對腫瘤之發生具有抑制之現象^(15,16,17)。BHT也可使授予二甲基肼(dimethylhydrazine)之C₃H小鼠之肝臟產生腫瘤但是BALB/C小鼠則否⁽¹⁸⁾。

BHA與BHT在某一特定之條件下對實驗動物具有腫瘤發生之促進作用,而對人體是否亦有同樣之性質,它在人體之作用機轉,致毒效應與其攝食後之危險性,應有待進一步評估。本研究係以生體內-生體外之混合研究模式研究大鼠之生體內模式授予AAF後,於短時間內取得肝臟上皮細胞,再以生體外之細胞培養模式來測定PB, BHA與BHT對細胞轉化(cell transformation)之促進效應之活性。

材料與方法

一、培養基與試劑

1. 培養基

F₁₀ base medium(F₁₀b, Biochem), F₁₀ complete medium (F₁₀C), H溶液(Solution H), 選擇性培養基 (Selective medium), F₁₀b + BSA(4g/l + mixed fatty acid 50 μ l/l)。

2. 試劑

GMNA (Koch-Light Ltd.), ¹²⁵I-表皮生長因

子 [^{125}I -epidermal growth factor (EGF); Collabor. Res.], 胰蛋白酶-EDTA (Trypsine-EDTA; 無 Ca^{2+} , Mg^{2+} ; M.A. Bioproducts), ^{14}C -白胺酸 (^{14}C -Leucine; CEA), ^{14}C -脯胺酸 (^{14}C -proline; CEA), ^{14}C -胸腺嘧啶 (^{14}C -thymidine; CEA), ^{14}C -蛋白質水解產物 (^{14}C -hydrolyate of protein; Amersham), 三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA)。

二、生體內起源作用與肝臟上皮細胞之選用

新生之大鼠(wistar), 以腹腔注射單一劑量之致肝癌物質 (hepatocarcinogen) 2-AAF (30 mg/kg) 誘發體內之起源作用⁽¹⁹⁾。一星期後自大鼠體中取得肝臟並經胰蛋白酶之消化作用 (trypsinization)⁽²⁰⁾, 後藉無血清之 Ham's F₁₀ 基礎培養基 + BSA 培養⁽²¹⁾, 以除去污染之纖維母細胞 (fibroblasts)⁽²¹⁾。經選用之肝臟上皮細胞予以正常培養20星期後檢測其在軟瓊脂 (soft agar) 上生長與 γ -麩醯基轉胺酶 (γ -GT) 之活性等以評估細胞轉化之情形, 若呈穩定狀態者可存放於液態氮中, 供繼代培養與腫瘤促進作用之實驗用。實驗用之細胞 E27x: E-肝臟上皮細胞, 27-第27次起源者, x-繼代數。

二、生體外腫瘤促進作用

(一) 抗氧化劑之配製與處理

經起源作用之肝臟上皮細胞, 以1%之DMSO (A) 為對照實驗組, 以 10^{-3}M (B), $3 \times 10^{-4}\text{M}$ (C) 與 10^{-4}M (D) 之 PB; 10^{-4}M (H), $3 \times 10^{-5}\text{M}$ (I) 與 10^{-5}M (J) 之 BHA 及 $3 \times 10^{-5}\text{M}$ (E), 10^{-5}M (F), $3 \times 10^{-6}\text{M}$ (G) 之 BHT 為實驗組作生體外之培養, 並在某一特定時間內於 37°C 之二氧化碳培養箱培養後測定細胞轉化之標識 (markers)。實驗值均是8次獨立試驗每次獨立試驗均三重複之平均值。

(二) 細胞轉化標識 (markers) 之測定

1. 細胞在瓊脂糖 (agarose) 上之生長狀況

培養之已起源之細胞 (3×10^5) 加入2 ml之完全培養基, 後取0.8 ml再滴入2 ml含0.4%瓊脂糖培養基, 再以1ml量置瓊脂糖培養基上, 於 37°C 之二氧化碳培養箱中培養三星期, 觀察細胞集落 (colony) 之產生情形, 另以無瓊脂糖之培養皿中作實驗對照用^(22,23)。

2. 細胞之增殖活性 (proliferative activity)

已起源之細胞 (3×10^5) 置於塑膠培養皿中經含不同濃度測試物質之培養基培養於 37°C 之二氧化

碳培養箱中14天, 於特定之時間內利用 coulter-counter 測定細胞數藉此確定細胞之增殖活性。

3. γ -麩醯基轉胺酶之活性 (γ -GT activity)

經不同濃度測試物質處理後之已起源細胞 (3×10^5) 置於試管中, 以組織化學定量方法加入 GMNA 試劑, 於 37°C 之二氧化碳培養箱中以每5分鐘旋轉一次之適當培養, 30分鐘後洗淨, 離心, 再藉細胞內桔紅色沈澱情形確定 γ -GT 之活性⁽²⁴⁾。

4. 表皮生長因子之鍵合 (EGF-binding) 活性

經不同濃度之各測試物質處理後之已起源細胞 (3×10^5) 置於試管中, 經 ^{125}I -EGF ($30\text{-}60 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) 於 37°C 之二氧化碳培養箱中培養3小時, 以 F₁₀b 洗淨後再加入2 ml之3% SDS, 後再培養於 40°C 中30分鐘, 洗淨後以 γ -counter 測定放射能強度, 藉以測定 EGF 之鍵合活性⁽²⁵⁾。

5. 蛋白質與DNA之合成活性

經不同濃度之測試物質處理後之已起源細胞 (3×10^5) 分置於含500 μl 培養基之24凹孔之微量培養皿 (microplate) 內, 經吸棄培養基後, 再分別各加入10 μl 之 ^{14}C -白胺酸 ($54\text{mCi}/\text{nmole}$), ^{14}C -脯胺酸 ($260\text{mCi}/\text{nmole}$), ^{14}C -蛋白質水解產物 ($57\text{mCi}/\text{nmole}$) 或 ^{14}C -胸腺嘧啶 ($54.8\text{mCi}/\text{nmole}$), 於 37°C 之二氧化碳培養箱中培養3小時, 後經多次以 F₁₀b 及 10N NaOH 洗淨並分置於試管中, 滴入5% TCA, 置 4°C 中一小時, 過濾, 再以5% TCA 10 ml 洗淨3次與10 ml之95%乙醇洗淨一次, 後以 scintillation counter 分別測定細胞溶質 (cytosol), 蛋白質與DNA中之放射能 (^{14}C) 強度, 藉以測定胺基酸與胸腺嘧啶之鍵入活性。

結果與討論

經2-AAF生體內起源作用後之27E大鼠肝臟上皮細胞系經不含血清之培養基培養二星期後選用之, 這些細胞於相同之條件下雖然經過20次以上之繼代培養後於含血清但不含腫瘤促進物質之培養基中培養, 細胞仍能夠維持不變性與穩定生長狀態, 因此本實驗乃選用27E之細胞供作測定 PB, BHA 與 BHT 等物質之促進細胞轉化之活性用。自27E₁₀開始, 細胞分別經非細胞毒性之三種不同濃度之 PB, BHA 與 BHT 培養結果27E₁₂, 27E₂₀ 與 20E₂₈ 之細胞在軟瓊脂上之生長並未出現集落 (colony) 現象。惟27E₂₆細胞之增殖活性與 PB, BHA 及 BHT 之濃度有明顯之關係, 如圖一, 圖二與圖三, 其中以 10^{-3}M 之 PB 與 10^{-4}M 之 BHA 培養時, 自培養之第四天開始細胞之增殖活性即明顯的受到抑制, 但是

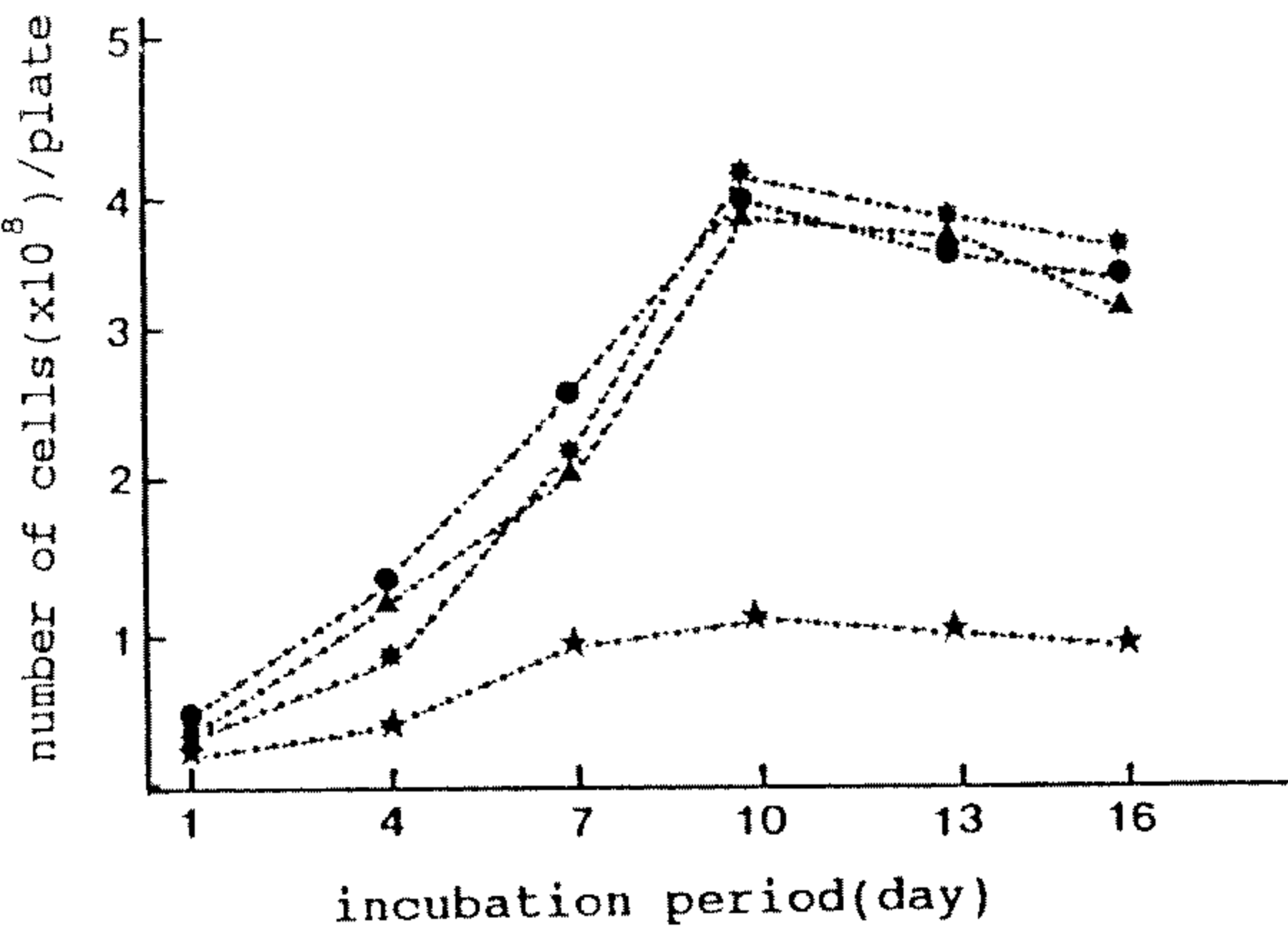


Figure 1. Proliferative activity of 27E₂₆ cells in the presence of phenobarbital.
*1% DMSO, ★10⁻³M, ●3×10⁻⁴M, ▲10⁻⁴M

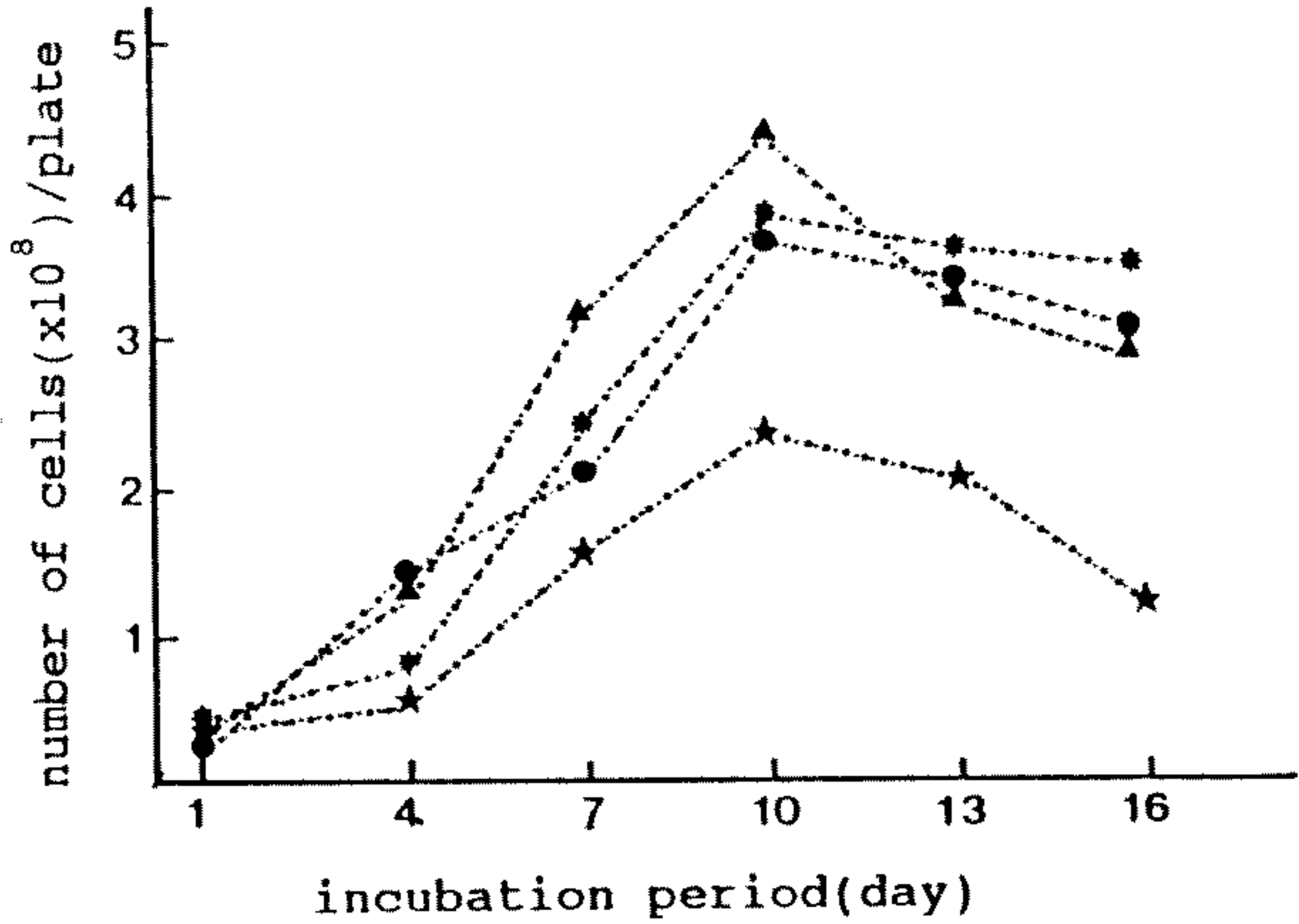


Figure 2. Proliferative activity of 27E₂₆ cells in the presence of butylated hydroxyanisole.
*1% DMSO, ★10⁻⁴M, ●3×10⁻⁵M, ▲10⁻⁵M

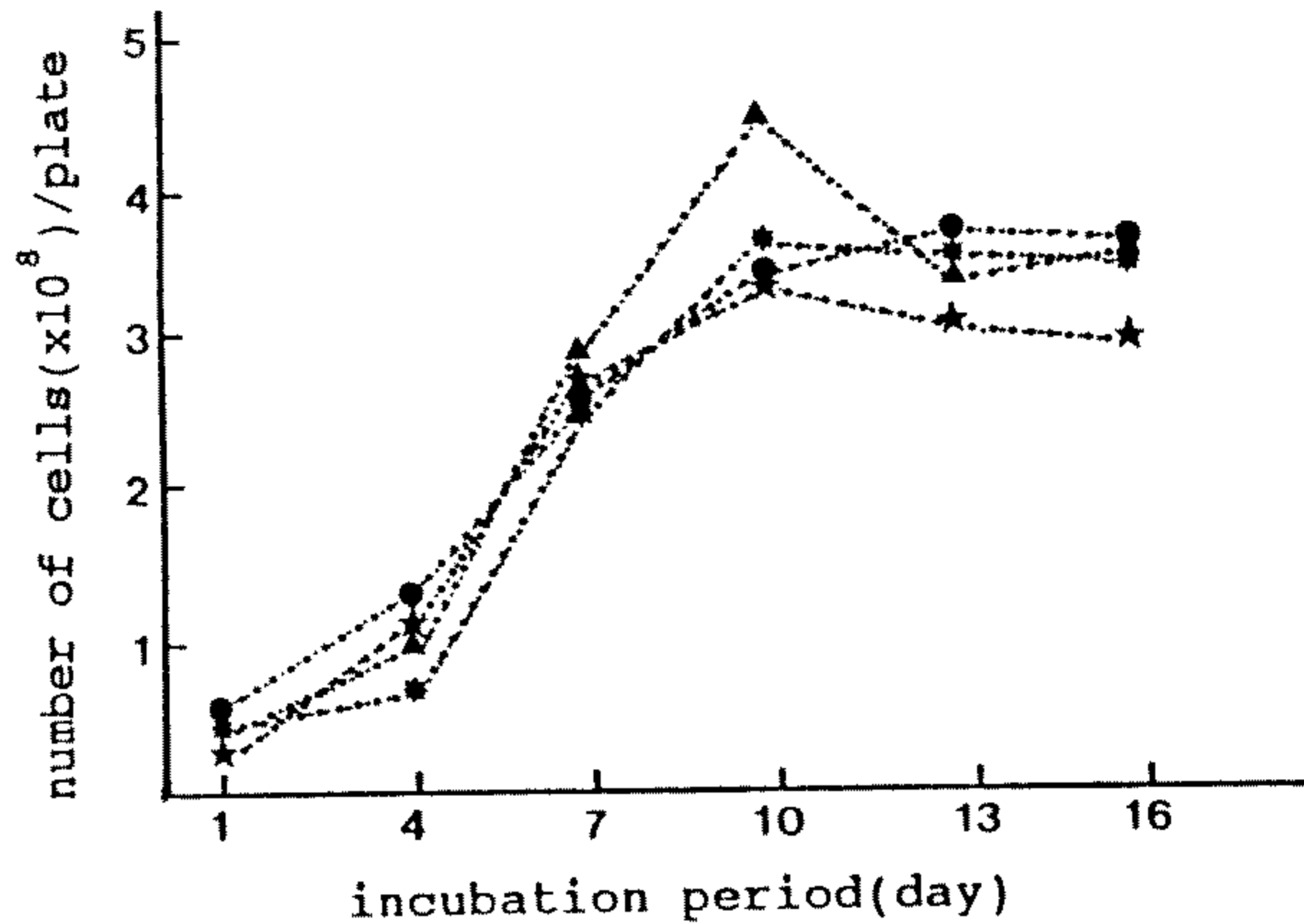


Figure 3. Proliferative activity of 27E₂₆ cells in the presence of butylated hydroxytoluene.
*1% DMSO, ★3×10⁻⁵M, ●10⁻⁵M, ▲3×10⁻⁶M

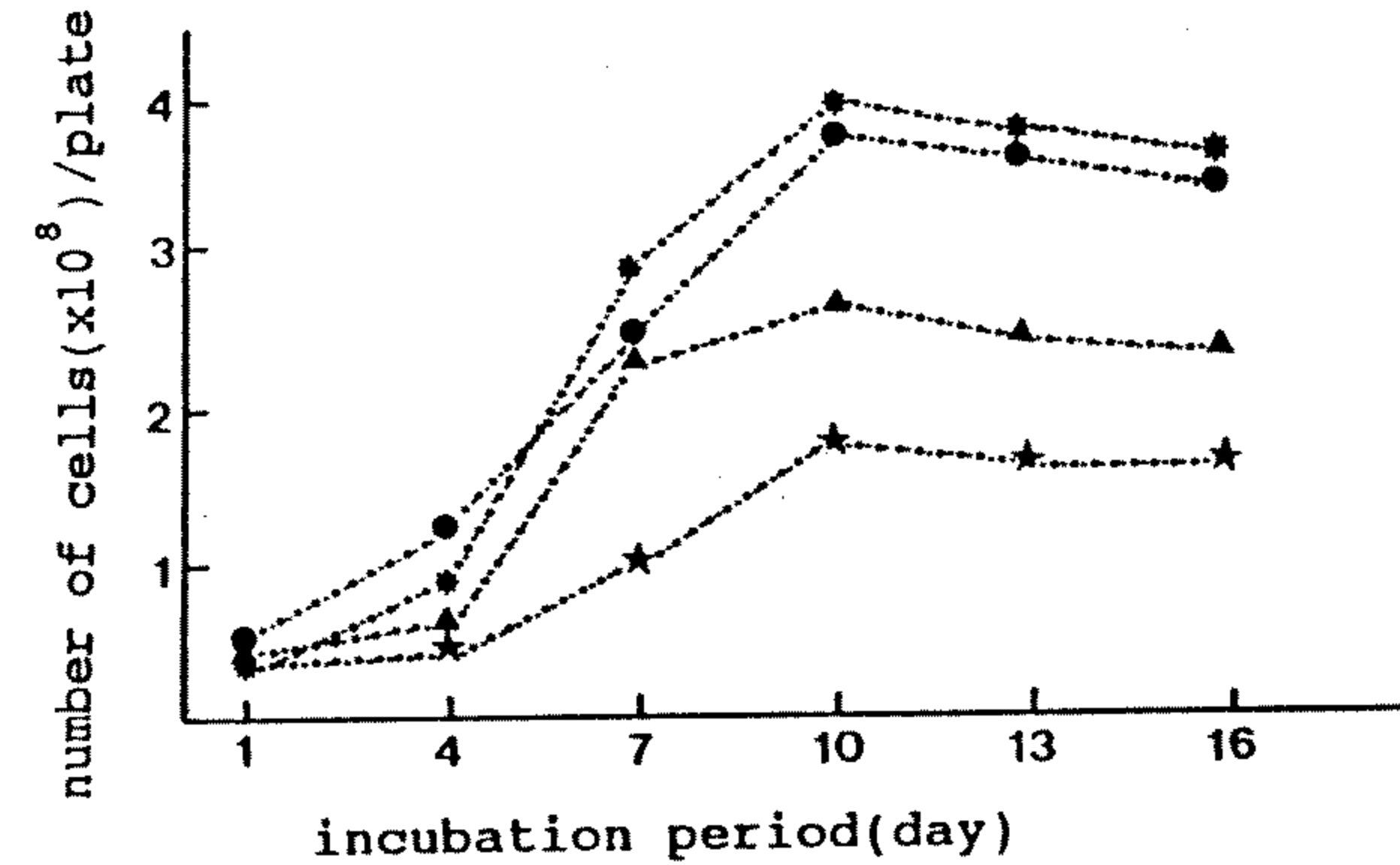


Figure 4. Comparison of proliferative activity of 27E₂₆ cells in the presence of highest concentration of phenobarbital, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole.
*1% DMSO, ★10⁻³M PB, ●3×10⁻⁵M BHT, ▲10⁻⁴M BHA

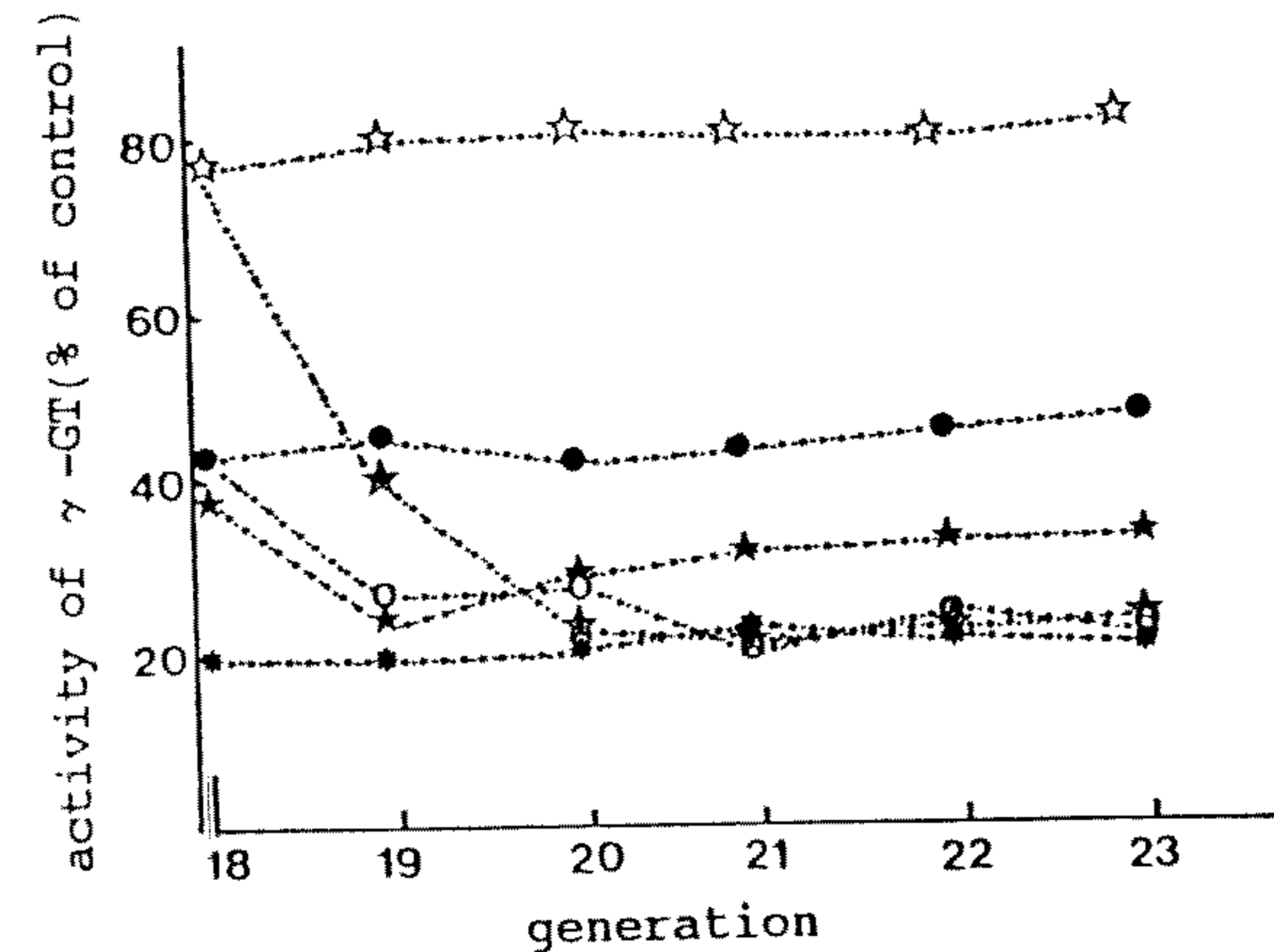


Figure 5. Reversibility of γ -GT activity in 27E cells.
*1% DMSO, ●10⁻³M PB, ★3×10⁻⁵M BHT, ☆10⁻⁴M BHA

The activity of γ -GT was reduced when PB(○) and BHA(☆) had been retired from cultural medium

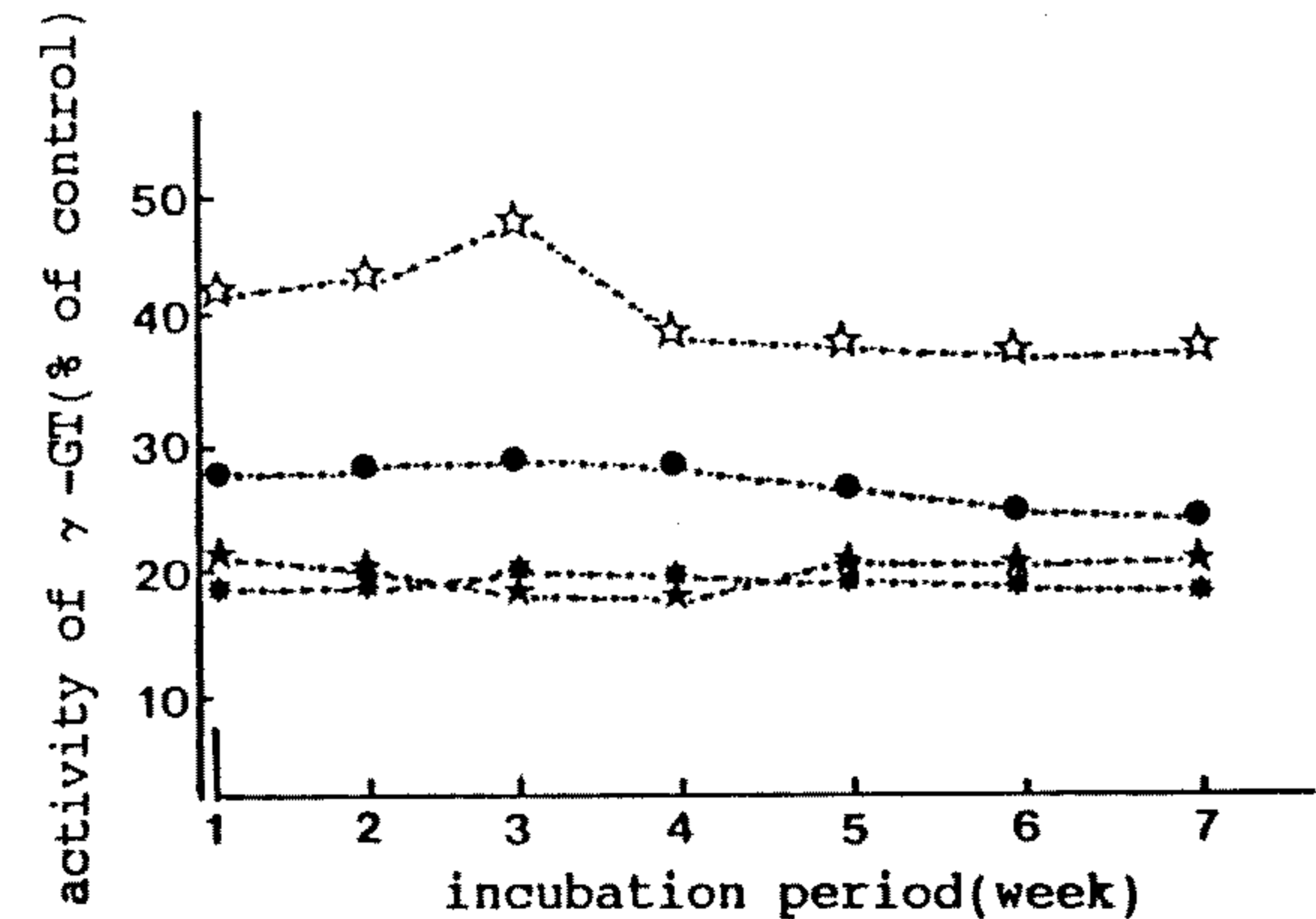


Figure 6. Induction of γ -GT activity of non-initiated 22E cells.
*1% DMSO, ●10⁻³M PB, ★3×10⁻⁵M BHT, ☆10⁻⁴M BHA

$3 \times 10^{-5} \text{M}$ 之BHT時則否,而至第10天開始該三種物質之濃度分別為 10^{-3}M , $3 \times 10^{-4} \text{M}$ 與 10^{-4}M 之PB, 10^{-4}M , $3 \times 10^{-5} \text{M}$ 與 10^{-5}M 之BHA及 $3 \times 10^{-5} \text{M}$ 之BHT時,細胞之增殖亦呈現逐漸減少之趨勢。若以最高濃度之PB,BHA與BHT比較之,經16天之培養,細胞之增殖情形如圖四,對細胞增殖活性之抑制能力以 10^{-3}M 之PB為最大, 10^{-4}M 之BHA次之, $3 \times 10^{-5} \text{M}$ 之BHT最小。

γ -GT係存在於細胞膜上之酵素,在胎兒大鼠肝臟中之活性非常凸顯,出生後很快會被抑制,但在特定之肝臟病變,尤其是某些化學致癌物誘發之肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)發生時,很明顯的有高量 γ -GT活性被誘發釋出。經起源作用後之27E大鼠肝臟上皮細胞若分別為 10^{-3}M 之PB, $3 \times 10^{-5} \text{M}$ 之BHT與 10^{-4}M 之BHA培養結果,如圖五,自第27E₁₈至27E₂₃, γ -GT之活性均呈穩定狀態,但自27E₁₈後以PB與BHA培養著若恢復以不含上述物質之培養基培養時,則 γ -GT之活性可迅速恢復正常。但若培養之細胞係未經源作用之22E與23E大鼠肝臟上皮細胞時,雖經上述同濃度之同物質培養七星期, γ -GT之活性尚屬正常,惟其中以 10^{-4}M 之BHA培養時之初期, γ -GT出現稍高之活性,但22E與23E細胞分別自第四與第二星期後即恢復穩定狀態,如圖六,圖七。惟其 γ -GT活性之誘導與已起源作用之27E細胞有明顯之差異,又以 10^{-4}M 之BHA培養之已起源作用之27E₁₂與27E₁₆細胞在15小時之內 γ -GT活性之誘導並無明顯增加現象,雖於第三小時開始出現較高之誘導活性,此現象可能係因為更新培養基所致。但若培養時間延長,至第三日以後,其誘導之 γ -GT活性會隨著培養時間之增加而增加。因此經AAF起源作用之大鼠

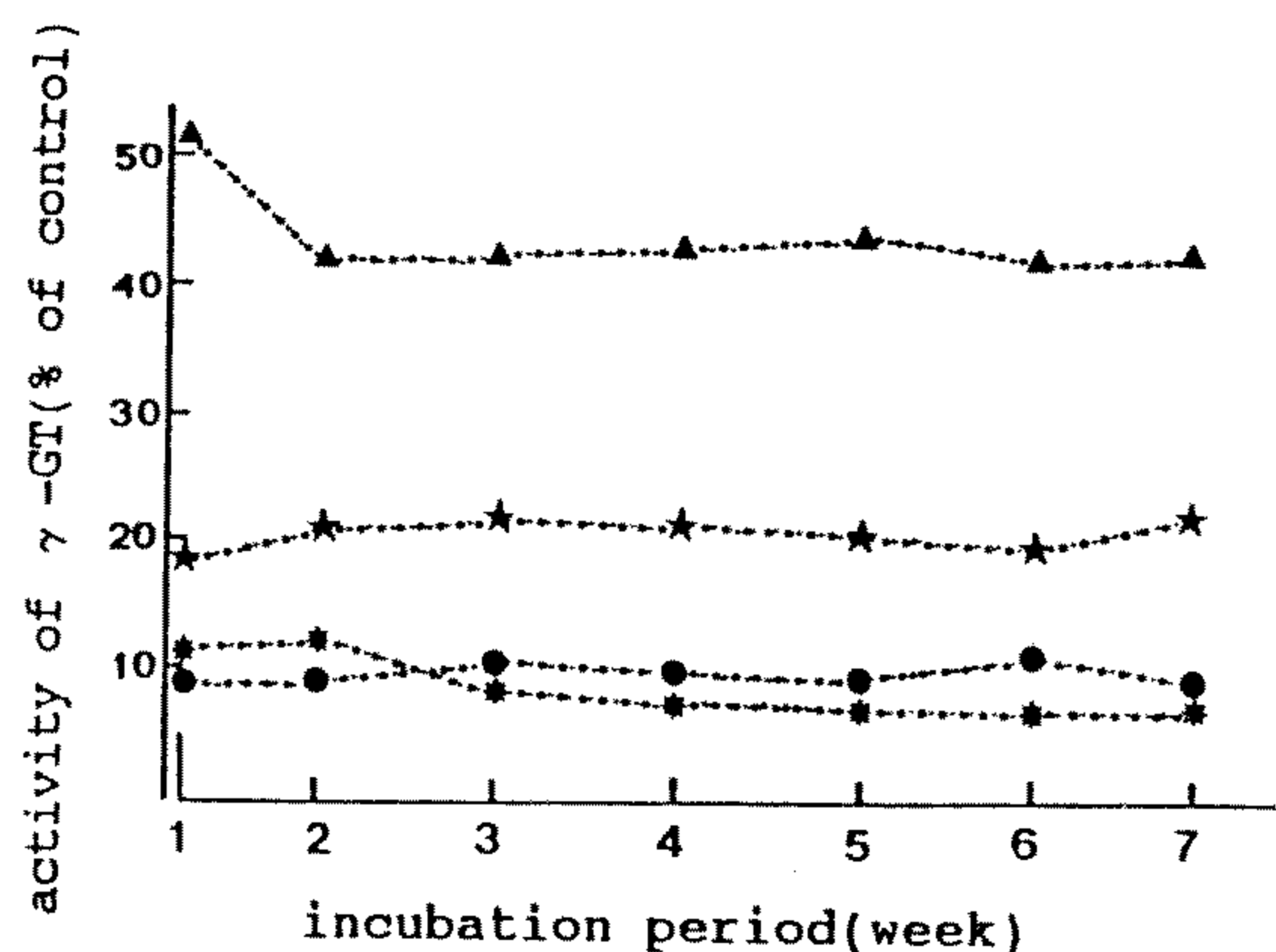


Figure 7. Induction of γ -GT activity of non-initiated 23E cells.

*1% DMSO, ★ 10^{-3}M PB, ● $3 \times 10^{-5} \text{M}$ BHT,
▲ 10^{-4}M BHA

肝臟上皮細胞,於極短時間內 γ -GT活性似乎無法增強,惟培養至第七日($p < 0.05$)時其誘導之活性可達到最高,如圖八。以不同濃度之PB,BHA,BHT培養經AAF起源作用後之大鼠肝臟上皮細胞其誘導 γ -GT活性之能力,如圖九。27E細胞中經六星期培養後之27E₁₃細胞, 10^{-4}M 之BHA誘導 γ -GT活性之能力($p < 0.01$)為最強,如分別經10星期與15星期培養時,PB與BHA誘導27E₁₇與27E₂₂細胞之 γ -GT活性與處理細胞之濃度成正相關性,惟BHA之誘導活性大於PB,且無細胞自然變異之情形。原培養細胞(primary culture cells)經致癌物,苯巴比妥或長期授予酒精後 γ -GT之活性會迅速增加⁽²⁶⁾,而 γ -GT之活性不但是肝細胞瘤生成前(preneoplastic)細胞化學(cytochemistry)標記⁽²⁷⁾也是肝腫瘤細胞之指標^(27,28,29,30),因此該活性之增加是確定大鼠肝臟細胞惡性腫瘤之形成也是致癌物質在體外誘導致肝癌作用(hepatocarcinogenesis)之早期探針(probe)^(31,32)。由實驗結果得PB,BHA與BHT誘導 γ -GT之活性有劑量-反應關係(dose-response manner)。若依據 γ -GT之活性與肝腫瘤細胞形成之密切相關性而言,該三種物質促進已起源細胞之轉化作用深值注意。

表皮生長因子(EGF)是多肽之物質,它存在於細胞內是影響細胞生長之因子,它具有有絲分裂之活性(activity of mitosis)。它亦可與胰島素(insulin)及胰增血糖素(glucagon)共同作用致影響肝臟細胞中DNA之合成⁽²⁴⁾。若正常之成年大鼠由腹腔注入EGF時肝臟中DNA之合成明顯增加⁽³²⁾,又

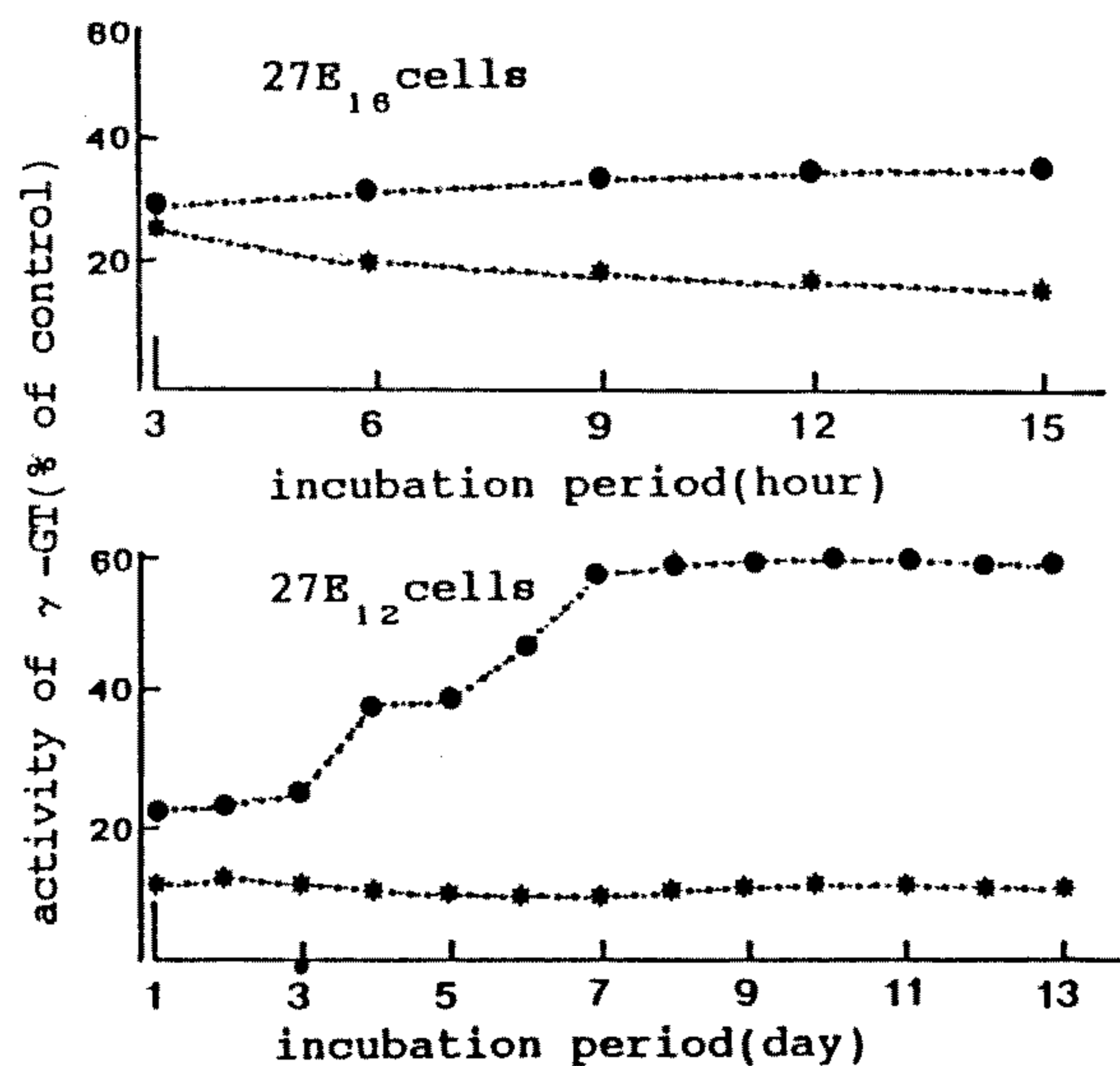


Figure 8. Induction of γ -GT activity of 27E cells by butylated hydroxyanisole.

*1% DMSO, ● 10^{-4}M BHA

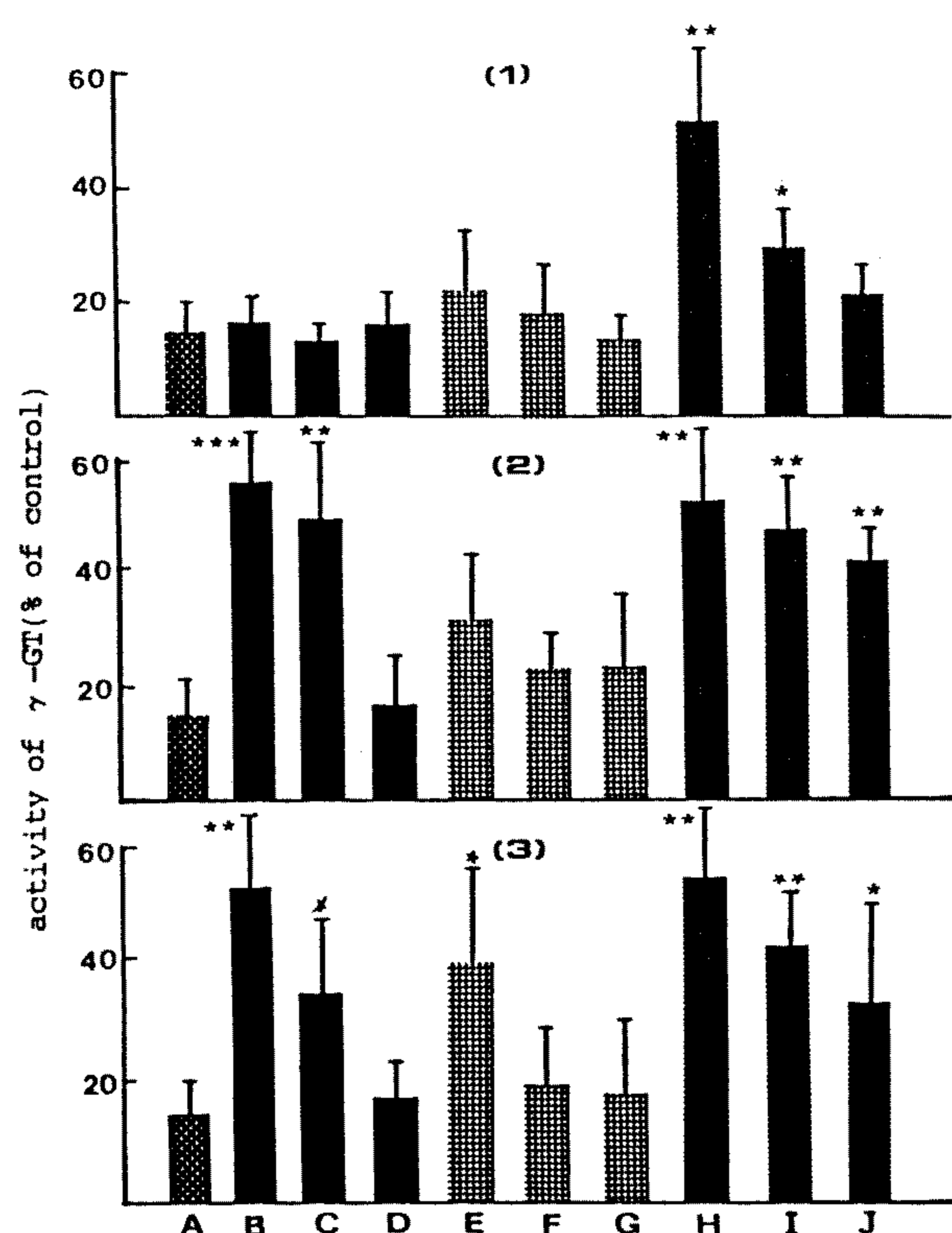


Figure 9. Induction of γ -GT activity by phenobarbital, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene.

(1) 27E₁₃ cells (after 6 weeks of incubation)

(2) 27E₁₇ cells (after 10 weeks of incubation)

(3) 27E₂₂ cells (after 15 weeks of incubation)

A : 1% DMSO, B : 10^{-3} M PB, C : 3×10^{-4} M PB, D : 10^{-4} M PB, E : 3×10^{-5} M BHT, F : 10^{-5} M BHT, G : 3×10^{-6} M BHT, H : 10^{-4} M BHA, I : 3×10^{-5} M BHA, J : 10^{-5} M BHA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (student's t-test)

若經EGF之處理則會導致肝臟肥厚(hypertrophy)與增殖(hyperplasia)及肝臟之擴大(hepatic enlargement)等現象⁽³³⁾。又例如在細胞培養系統中TPA之濃度達 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ mg時能阻斷 125 I-EGF與細胞表面受體(cell surface receptors)之鍵合^(32, 35, 36, 37)，此現象類似增效作用而致加強DNA合成之刺激作用，也似乎可誘導有絲分裂活性(mitogenic activity)之強化，甚至EGF之鍵合活性亦可作某些細胞增生(neoplasia)之標記(marker)⁽³⁸⁾。在可能影響EGF與細胞鍵合活性之條件如血清濃度，細胞濃度及細胞株年齡等^(39, 40, 41, 42)完全相同之情況下，27E₂₃細胞於不同濃度之PB, BHA與BHT培養結果，有效EGF鍵合之活性與濃度有密

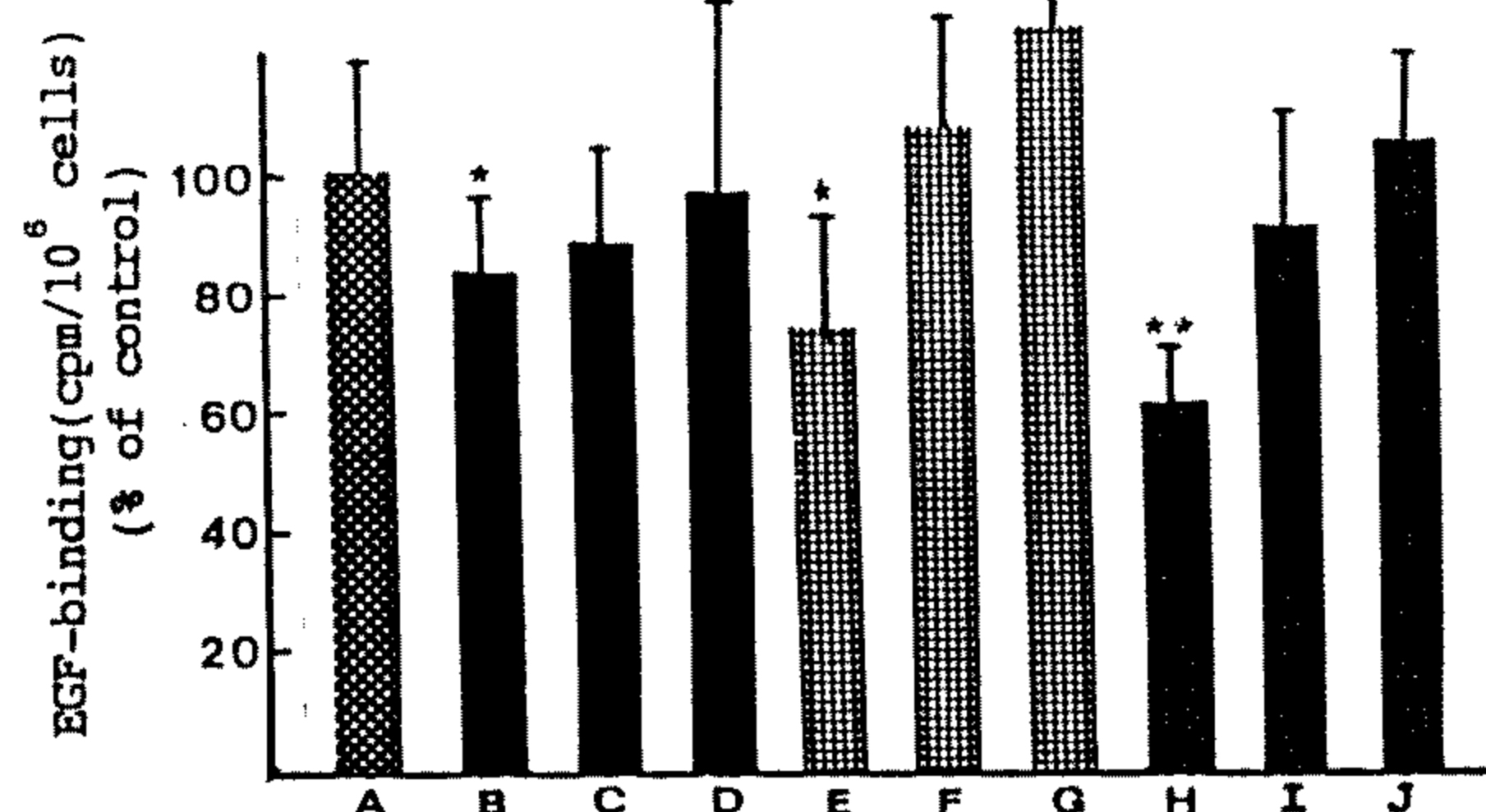


Figure 10. Effect of epidermal growth factor binding activity to confluent 27E₂₃ cells by phenobarbital, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole.

A : 1% DMSO, B : 10^{-3} M PB, C : 3×10^{-4} M PB, D : 10^{-4} M PB, E : 3×10^{-5} M BHT, F : 10^{-5} M BHT, G : 3×10^{-6} M BHT, H : 10^{-4} M BHA, I : 3×10^{-5} M BHA, J : 10^{-5} M BHA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (student's t-test)

切關係，如圖十，EGF鍵合於細胞中受到抑制現象以BHA為 10^{-4} M時之效應最高，惟此變化並未與該三種物質誘導培養細胞之增殖同時發生，事實上PB對減少細胞生長之活性較大，且比減少有效EGF活性之反應更為明顯與有效，相反地BHT並不改變半數EGF鍵合受抑制之細胞發育，因此對細胞而言似乎因由EGF而誘發之刺激作用(stimulation)並非其生長之限制因素。三種不同濃度之PB, BHA與BHT之培養下27E₂₃細胞中EGF之鍵合活性隨其培養濃度之增加而減少，另由其變化現象顯示細胞中EGF之鍵合活性在短時間內培養時之可逆性似乎非常顯著，然若以不含腫瘤促進物質之培養基取代培養時，經一夜後不再出現有效EGF鍵合活性之規律性抑制現象，如圖十一。

γ -GT之活性是腫瘤發生之指標，它對細胞排泄及吸收具有催化之能力也可參與穀胱甘肽(glutathione)之代謝作用及中性胺基酸透過細胞膜之功能等，如果肝細胞中 γ -GT活性受到腫瘤促進物質之誘導而改變時，相同地，細胞內胺基酸之運輸功能亦會發生變更，同時也會導致蛋白質合成反應之干擾。 14 碳-白胺酸是 γ -GT之受體(receptor)，又雖然 14 碳-脯胺酸能借助於 γ -GT但也很不易穿過細胞膜，27E₃₂細胞經腫瘤促進物質處理後，細胞內之 14 碳-白胺酸， 14 碳-脯胺酸與 14 碳-蛋白質水解產物及蛋白質量會受到影響，一般而言該細胞內胺

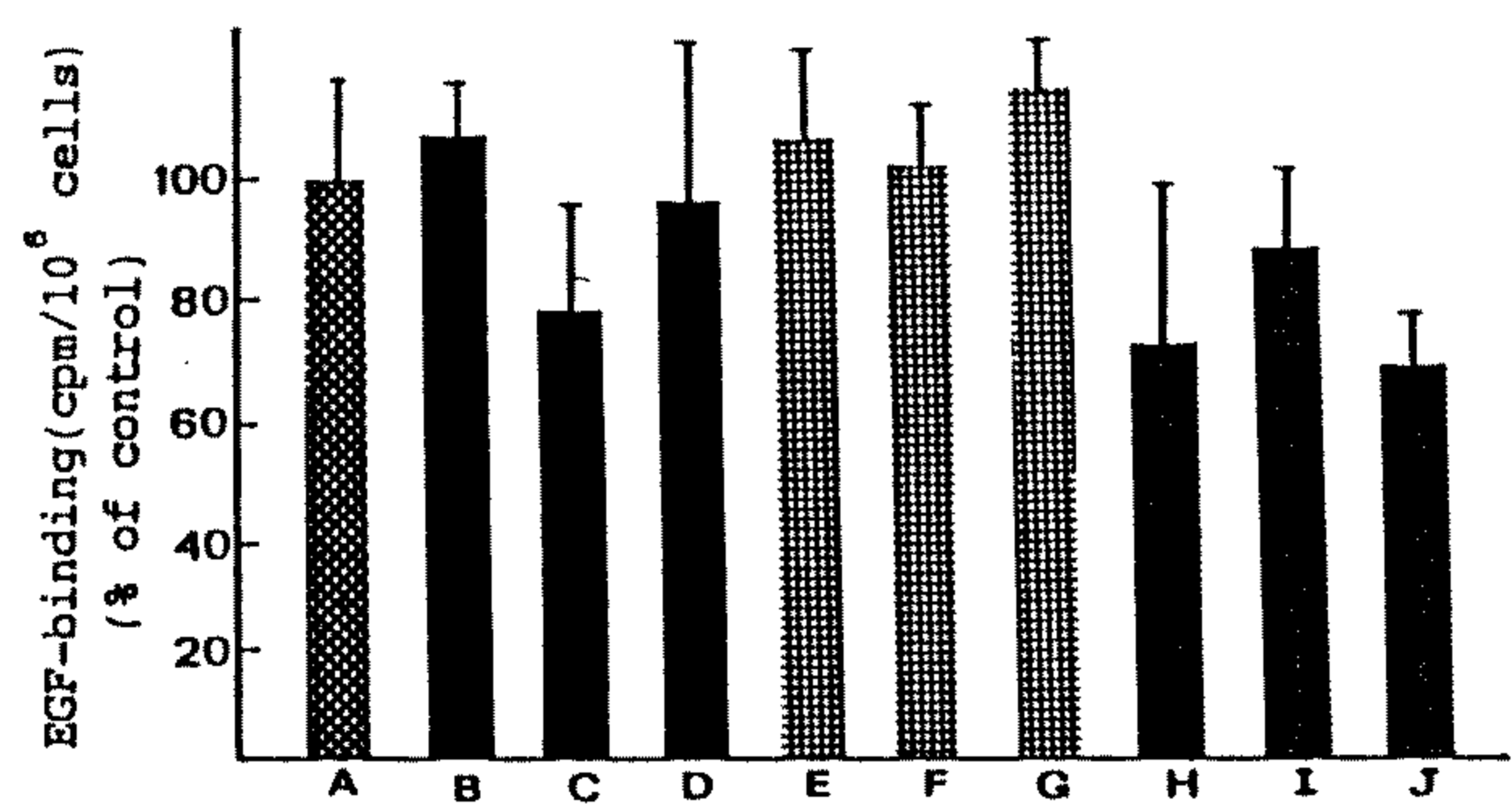


Figure 11. The binding activity of Epidermal growth factor to confluent 27E₂₃ cells when phenobarbital, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole was retired overnight.
A : 1% DMSO, B : 10⁻³M PB, C : 3×10⁻⁴M PB, D : 10⁻⁴M PB, E : 3×10⁻⁵M BHT, F : 10⁻⁵M BHT, G : 3×10⁻⁶M BHT, H : 10⁻⁴M BHA, I : 3×10⁻⁵M BHA, J : 10⁻⁵M BHA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (student's t-test)

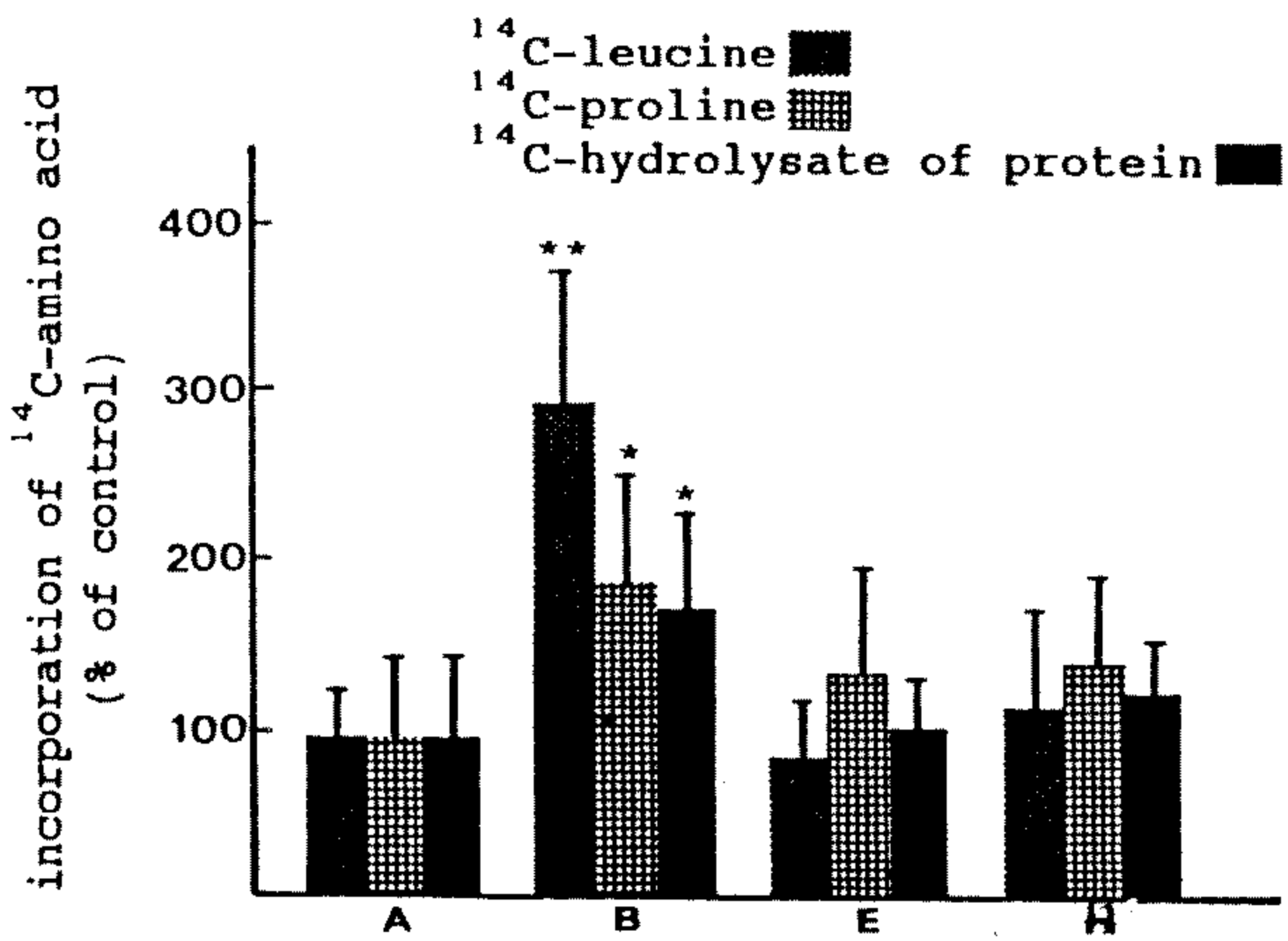


Figure 12. Effect of incorporation of ¹⁴C-amino acid in protein of confluent 27E₃₂ cells by phenobarbital, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole.
A : 1% DMSO, B : 10⁻³M PB, E : 3×10⁻⁵M BHT, H : 10⁻⁴M BHA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (student's t-test)

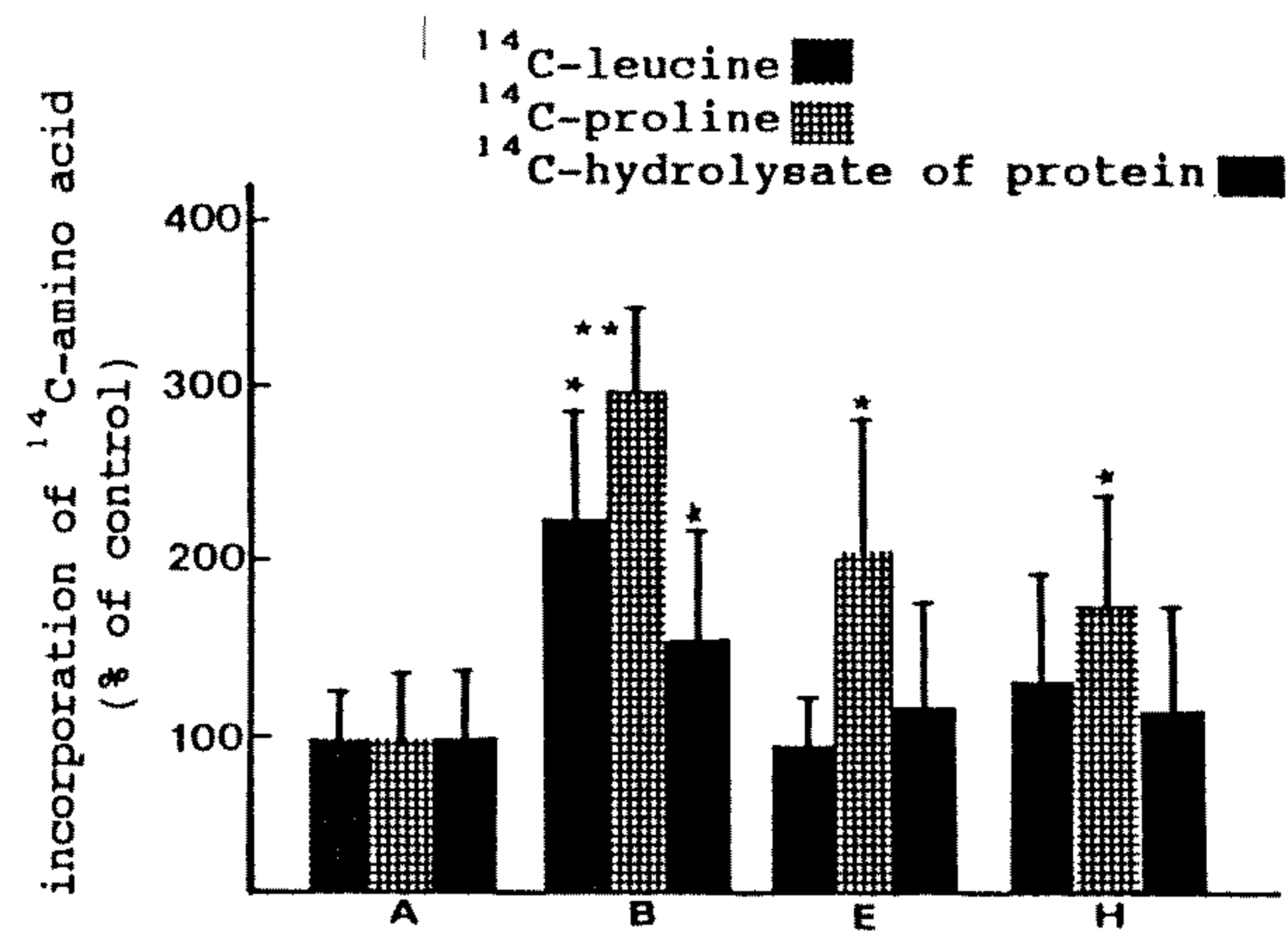


Figure 13. Effect of incorporation of ¹⁴C-amino acid in cytosol of confluent 27E₃₂ cells by phenobarbital, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole.
A : 1% DMSO, B : 10⁻³M PB, E : 3×10⁻⁵M BHT, H : 10⁻⁴M BHA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (student's t-test).

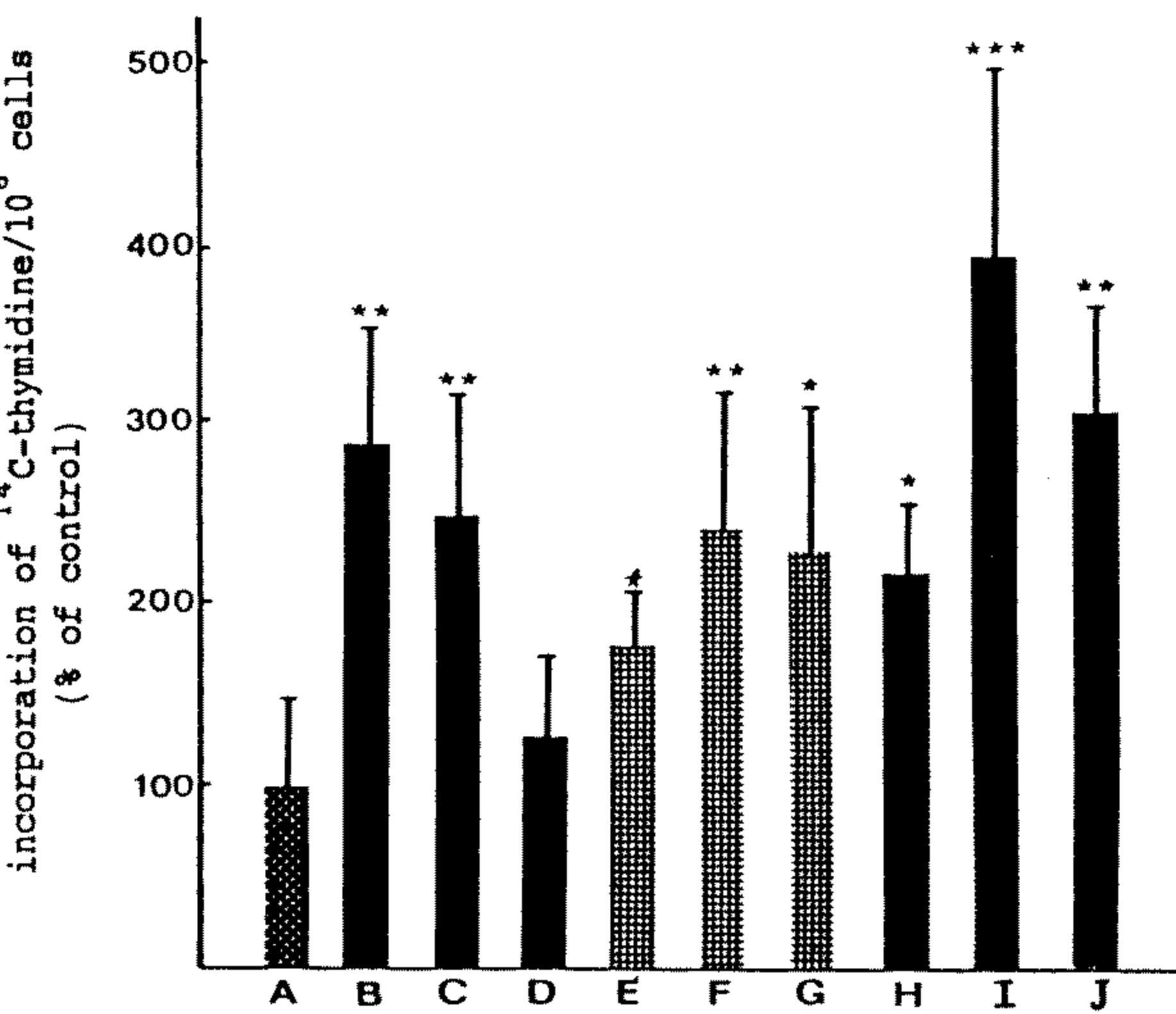


Figure 14. Effect of incorporation of ¹⁴C-thymidine in DNA of epithelial cells by phenobarbital, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole.
A : 1% DMSO, B : 10⁻³M PB, C : 3×10⁻⁴M PB, D : 10⁻⁴M PB, E : 3×10⁻⁵M BHT, F : 10⁻⁵M BHT, G : 3×10⁻⁶ M BHT, H : 10⁻⁴M BHA, I : 3×10⁻⁵M BHA, J : 10⁻⁵M BHA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (student's t-test)

基酸之運輸會受到刺激效應，如圖十二，圖十三，這種現象尤以PB培養時，其在蛋白質合成之增強上扮演重要角色，又於蛋白質或細胞質中脯胺酸之鍵入也可因腫瘤促進物質之培養而呈明顯增加，白胺酸之鍵入細胞質之情形亦同。另外也顯示γ-GT活性誘導時白胺酸似乎係擔任其受體之功能。關於

¹⁴碳-胸腺嘧啶鍵入DNA之情形，如圖十四。經三種物質之處理時所有細胞之DNA中¹⁴碳(¹⁴C)之鍵入活性之增加均明顯地受到刺激。
三種物質誘導γ-GT活性之效應，以BHA之效

果為最佳,BHT之效果最小若以誘導時間而言PB較BHA為遲,且其誘導之幅度及該物質之濃度與在肝臟中之誘導時間有密切關係。但授予任何濃度後經25星期之培養,似乎不影響細胞在軟瓊脂上之生長,另外於塑膠培養皿中培養者,僅於 10^{-3} M之PB時具有減緩細胞生長速度與 10^{-4} M之BHA時可減少細胞集落之數目。又以顯微鏡觀察,部份以 10^{-3} M之PB與 10^{-4} M之BHA培養之細胞生殖比對照實驗組較占優勢,惟若以Coulter-Counter測定時,其平均面積內之細胞數並未顯示其有意義之生長現象,由此實驗得知高濃度之PB與BHA影響細胞之生長似乎並非簡單之細胞毒性效應,事實上該物質雖未改變細胞之重要功能,但已影響了蛋白質合成與DNA之複製,以致可測得胸腺嘧啶與白胺酸鍵入之活化現象。白胺酸與胸腺嘧啶鍵入大分子中活性之增加,或可能係因放射性先驅物質進入細胞而導致簡單但特殊之干擾作用,結果形成胸腺嘧啶鍵入之增加。又PB,BHA與BHT於高濃度時可誘致EGF在培養細胞中鍵合活性之減少,但該細胞若恢復正常之培養,則其可能恢復正常,因此其鍵合之減少可能係EGF之受體(receptor)之相似性所致,或因其含受體數量之差異所致。此結果與1986年Hwang⁽⁴³⁾及1988年Gupt等⁽⁴⁴⁾之研究,觀察生體內因PB之作用而導致EGF鍵合減少之情形相同。由於該三種物質誘導 γ -GT活性增加與EGF鍵合活性降低之反應係均位於細胞之膜中,因此上述反應發生之原因可能係因該試驗物質進入細胞之膜內後直接導致細胞膜結構與功能之紊亂,效應物-受體(effector-receptor)相似性之改變,也可能直接改變膜蛋白質(γ -GT,EGF之受體)之表現所致,其作用之機轉有待更深入探討。

參考文獻

1. Berenblum, I. 1974. Carcinogenesis as a biological system. A. Neuberger and E.L. Tatum.eds. American Elsevier, New York.
2. Yamasaki, H. 1984. Modulation of cell differentiation by tumor promoters, In : Mechanism of tumor promotion. vol. IV. Cellular responses to tumor promoters. Slaga, T. eds. CRC press, Boca Raton FL, USA, 1-27.
3. Peraino, C., Fry, R.J.M. and Staffeldt, E. 1971. Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res. 31 : 1506-1512.
4. Solt, D. and Farber, E. 1976. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature. 263 : 701-703.
5. Trosko, J., Chang, C. and Medcalf, A. 1983. Mechanism of tumor promotion potential role of intercellular communication. Cancer Invest. 1 : 511-526.
6. Nissizwka, Y. 1984. The role of protein kinase C in the cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature. 308 : 693-698.
7. Hsiao, W.L.M. and Weinstein, I.B. 1986. Oncogene induced transformation of a rat embryo fibroblast is enhanced by tumor promoters. Mol. Cell Biol. 6 : 1943-1950.
8. Lafarge-Frayssinef, C., Garcette, M., Ravier, R., Morel-Chany, E. and Frayssient, C. 1988. Expression of Ki-ras, myc and fos proto-oncogenes during progression of spontaneous malignant transformation of epithelial rat liver cell in culture. colloque, international "cellules hépatiques et médicaments" Rennes, eds. INSERM, John Libbey Eurotext. 74-81.
9. Kitagawa, T., Watanabe, R., Kayano, T. and Sugano, H. 1980. *In vitro* carcinogenesis of hepatocytes obtained from acetylfluorene treated rat liver and promotion of their growth by phenobarbital. Cann. 71 : 747-750.
10. Vaheri, A. and Mosher, D.F. 1978. High molecular weight, cell surface associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. Biochem. Biophys. Acta. 516 : 1-25.
11. Ito, N., Hirose, M., Fu Kushima, S., Tsuda, H. and Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants : their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. Fd. Chem. Toxic. 11 : 1071-1082.
12. Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E. and Christopher, J.P. 1977. Enhancing effects of phenobarbitone and BHT on 2-acetylaminofluorene induced hepatic tumorigenesis in the rat. Fd. Cosmet. Toxicol. 15 : 93-96.
13. Hagiwara, A., Diwan, B.A. and Ward, J.W. 1986. Modifying effects of butylated hydroxy-anisole, di(2-ethylexyl)phtalate of indome-

- thacin on mouse hepatocarcinogenesis initiated by nitrosodiethylamine, Jpn. J. Cancer Res. 77 : 1215-1221.
14. Preat, V. De Gerlache, J., Lans, M. Taper, H. and Roberfroid, M. 1986. Comparative analysis of the effect of phenobarbital, dichlorodiphenyltrichloroethane, butylated hydroxytoluene and nafenopin on rat hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis. 7 : 1025-1028.
15. Wattenberg, L.W. 1986. Protective effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis. Fd. Chem. Toxic. 24 : 1099-1102.
16. Schulte-Hermann, R. 1985. Tumor promotion in the liver. Arch. Toxicol. 57 : 147-159.
17. Williams, G.M. 1983. Epigenetic effect of liver tumor promoters and implication for health effects. Environ. Health Perspect. 50 : 174-183.
18. Witschi, H.P. 1986. Enhanced tumor development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. Fd. Chem. Toxic. 24 : 1127-1130.
19. Peraino, C., Staffeldt, E.F. and Ludeman, J. A. 1981. Early appearance of histochemical altered hepatocyte and liver tumor in female rats treated with carcinogen one day after birth. Carcinogenesis. 2 : 463-465.
20. Chessebeuf, M., Olsson, A., Bournot, P., Desgres, J., Guiguet, M., Maume G., Maume, B.F., Perissel, B. and Padieu, P. 1974. Long term cell culture of rat liver epithelial cells retaining some hepatic functions. Biochimie. 56 : 1365-1379.
21. Chessebeuf, M. and Padieu, P. 1984. Rat liver epithelial cell in a serum-free medium : primary culture and derived cell lines expressing differentiated function. *In vitro*. 20 : 780-795.
22. Montagnier, L. and Gruest, J. 1979. Cell-density dependence for growth in agarose of two human lymphoma lines and its decrease after Epstein-Barr virus conversion. Int. J. Cancer. 23 : 71-75.
23. Suzuki, F., Suzuki K. and Nikaido, O. 1983. An improved soft agar method for determining neoplastic transformation *in vitro*. J. Tissue Culture Methods. 8 : 109-113.
24. Rotenburg, A.M., Rim, H., Fischbein, J., Hanker, J., Wasserkrug, H. and Selignan, A. 1969. Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl-transpeptidase activity. J. Histochem. Cytochem. 17 : 517-526.
25. Matrisian, L., Bowden, G.T. and Magun, B. E. 1981. Mechanism of synergistic induction of DNA synthesis by EGF and tumor promoter. J. Cell Physiology. 108 : 417-425.
26. Barouki, R., Chobert, M.N., Finidori, J., Billon M.C. and Hanoune, J. 1983. Molecular and cellular. Biochemistry. 53/54 : 77-78.
27. Vanderlann, M., Cutter, C. and Dolbeare, F. 1979. Flow microfluorometric of liver cells with elevated Gamma-glutamyl-transpeptidase activity after carcinogens exposure. J. Histochem. cytochem. 27 : 114-119.
28. Farber, E. and Cameron, R. 1980. The sequential analysis of liver cancer development. Adv. cancer Res. 31 : 125-226.
29. Pitot, H.C. and Sirica, A.E. 1980. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochem. Biophys. Acta. 605 : 191-215.
30. Williams, G.M. 1980. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogenesis. Biochem. Biophys. Acta. 605 : 167-189.
31. Farber, E., Hartman, S.D. and Cameron, R. 1976. Precancerous liver cell population and their identification fundamentals in cancer prevention. Magee, P.N. eds. University park press, Baltimore Md. p71-87.
32. Fiala, S., Mohindru, A., Kettering, W.G., Fiala A.E. and Morris, H.P. 1976. Glutathione and γ -glutamyltranspeptidase in rat liver during chemical carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 57 : 81-96.
33. Bucher, N.L.R., Patel, U. and Cohen, S. 1978. Hormonal factors and liver growth. Adv. Enzyme Regul. 16 : 205-213.
34. Lee, L.S. and Weinstein, I.B. 1978. Tumor-promoting phorbol esters inhibit binding of epidermal growth factor to cellular receptors,

- Science. 202 : 313-315.
35. Lee, L.S. and Weinstein, I.B. 1979. Mechanism of tumor promoter inhibition of cellular binding of epidermal growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 : 5168-5172.
 36. Brown, K.D., Dicker, P. and Rozengurt, E. 1979. Inhibition of epidermal growth factor binding to surface receptors by tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86 : 1037-1043.
 37. Murry, A.W. and Fusening, N.E. 1979. Binding of epidermal growth factor to primary and permanent cultures of mouse epidermis inhibition by tumor promoting phorbol ester. *Cancer Letters.* 7 : 71-77.
 38. Green, H., Kehinde, O. and Thomas, J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Pro. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 76 : 5665-5668.
 39. Capenter, G. and Cohen, S. 1979. Epidermal growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 48 : 193-219.
 40. Brown, K.D., Yeh, Y.C. and Holley, R.W. 1979. Binding internalization and degradation of epidermal growth factor by BALB 3T and BP 3T3 cells : relationship to cell density and the stimulation of cell proliferation. *J. Cell Physiol.* 100 : 227-238.
 41. Pratt, R.M. and Pastan, I. 1978. Decreased binding of epidermal growth factor to BALB 3T3 mutant cells defective in glycoprotein synthesis. *Nature.* 272 : 68-70.
 42. Bhargava, G., Rifas, L. and Markman, M.H. 1979. presence of epidermal growth factors receptors and influence of epidermal growth factor on proliferation and aging in culture smooth muscle cell. *J. cell Physiol.* 100 : 365-374.
 43. Hwang, D.L., Roitman, A., Lev-Ran, A. and Carr, B.I. 1986. Chronic treatment with phenobarbital decreases the expression of rat liver EGF and insulin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 135 : 501-506.
 44. Gupta, C., Hatton, A., Betschart, J.M., Virji, M.A. and Shindzuka, H. 1988. Modulation of epidermal growth factor receptor in rat hepatocytes by two liver tumor-promoting regimens, a choline deficient and a phenobarbital diet. *Cancer Res.* 48 : 1162-1165.

Studies on The Promotion of Transformation of Initiated Rat Liver Epithelial Cell by Phenobarbital, Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene

HSINN-HSHIUNG TSENG AND *WENG-FOUNG HUANG

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan
161-2, Kuen Yang Street, Nan Kang, Taipei, Taiwan, R.O.C.*

**Graduate Institute of Health & Welfare Policy, National Yang-Ming University,
Shih-Pai, Taipei 11221, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

Newborne wistar rats were injected (i.p) with a single dose of 2-acetylaminofluorene (2-AAF) for *in vivo* model of initiation, one week later, the liver epithelial cells were obtained by a trypsinization of the pooled livers and used for *in vitro* model to evaluate the promotion of cell transformation by phenobarbital (PB), butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). In the absence of promoting treatment, the initiated liver epithelial cells

remained untransformation at least during 20 weeks of culture. At the certain concentration, not only the growth and proliferative activity of the initiated liver epithelial cells were effected but also the marker of the transformation and malignant tumor such as the activity of γ -glutamyltranspeptidase, epidermal growth factor binding and DNA increasing were induced in a dose-response manner by *in vivo-in vitro* combination model.

Key Words : phenobarbital (PB), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), cell transformation.

