

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

環氧苯乙烯與其光學異構物之分子致突變機制研究※ ※ Molecular mechanism of mutations induced by styrene oxide and its optical isomers *in vivo* and *in vitro*

計畫編號：NSC 89-2320-B-039-012-

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：江素瑛

中國醫藥學院中國醫學研究所

一、中文摘要

苯乙烯(styrene)為一廣泛使用的工業化學藥品，雖然致癌動物實驗中未能證實其致癌性，苯乙烯對人體健康的影響仍然備受關切。因為在生物體內苯乙烯會被代謝活化成具有 R 型(R-SO)或 S 型(S-SO)的光學異構物的環氧苯乙烯(styrene oxide; SO)，而 SO 為一動物致癌物與可能人類致癌物。SO 在體內可進一步被 glutathione S-transferase (GST) 與 epoxide hydrolase (EH) 代謝而失去活性，先前的研究報告指出 GST 與 EH 對 SO 光學異構物有選擇性的偏好，推測 R-SO 與 S-SO 可能會產生不同的致細胞毒性與致突變性。此計畫的主要目的為比較研究這兩種 SO 光學異構物於體外誘發細胞毒性與基因突變的差異性探討。使用體外培養的 TK6 人類淋巴母細胞，測量 SO 與其光學異構物誘發細胞毒性與 *hprt* 或 *tk* 基因突變機率的差異性。實驗結果顯示以 60, 120 與 180 μM 的 R-SO、S-SO 與(R+S)-SO 暴露 TK6 細胞 24 小時，R-SO、S-SO 與(R+S)-SO 對 TK6 細胞有致細胞毒性與致突變性，並呈現劑量反應關係。以 120 μM 濃度之 R-SO、S-SO 與(R+S)-SO 處理 TK6 細胞，其細胞相對存活率依次為 50.55、56.25 與 51.24%。在 120 μM 濃度下 R-SO、S-SO 與(R+S)-SO 所引發 *hprt* 基因的突變率分別為 25.1×10^{-6} 、 24.1×10^{-6} 與 35.0×10^{-6} 。在 120 μM 劑量作為比較，R-SO 引發 *tk*-slow 基因之突變率為 41.1×10^{-6} ，S-SO 為 28.0×10^{-6} ，(R+S)-SO 為 31.7×10^{-6} 。利用無母數分析 (Wilcoxon signed rank test) 方法分析，結果顯示 R-SO、S-

SO 與(R+S)-SO 三者之致細胞毒性與致突變性在 TK6 細胞並沒有達到統計上的顯著差異 ($p>0.05$)，R-SO 與 S-SO 可能對 SO 在 TK6 細胞的致毒性與致突變性上扮演著類似重要的角色。鑑於體外培養細胞與動物體內的生理環境因子可能不同，體外實驗結果不一定能代表動物的效應。我們正著手進行研究這兩種 SO 光學異構物於老鼠體內誘發基因損傷與突變的差異性，這些結果將有助於了解 SO 與其光學異構物之相對致突變機制

關鍵詞：苯乙烯、環氧苯乙烯、光學異構物、致細胞毒性、致突變性、*hprt* 基因、*tk* 基因

Abstract

Although no dose-related increases in the incidence of tumors have been observed in cancer bioassays with styrene, exposures to styrene are still of great health concern based upon its bioactivation to styrene oxide (SO). In contrast to styrene, SO formed as mixtures of R- and S-enantiomers *in vivo* has been classified as a probable human carcinogen and an established rodent carcinogen. Previous studies have shown that R-SO and S-SO are differentially detoxified by epoxide hydrolase and glutathione S-transferase, suggesting that SO enantiomers may differ in their potential for eliciting cytotoxic and mutagenic effects *in vivo* and *in vitro*. The proposed study examined the relative contribution of these two isomers in the cytotoxicity and mutant frequency induced by the racemic SO (R+S) *in vitro*. We determined the cytotoxicity, frequencies

of mutations at the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*hprt*) gene and thymidine kinase (*tk*) gene in TK6 human lymphoblastoid cells treated with SO and its isomers. Our data showed that R-SO, S-SO and (R+S)-SO were cytotoxic and mutagenic in TK6 cells in a dose-dependent fashion. However, there is no statistically significant difference among R-SO-, S-SO- and (R+S)-SO-induced cytotoxicity, *hprt* and *tk* mutant frequencies. Taken together, R-SO and S-SO may play a similar important role in SO-induced cytotoxicity and mutagenicity. Currently, we are studying the *hprt* mutation frequency induced in mice following exposure to SO and its optical isomers to shed light on the mechanisms of differential biological effects induced by SO and its optical isomers *in vivo*. The data obtained from this project may help ascertain the relative contribution of R-SO and S-SO to the overall mutagenic burden produced by styrene *in vivo*, and advance our understanding of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis of SO.

Keywords: styrene, styrene oxide, optical isomer, cytotoxicity, mutagenicity, *hprt* gene, *tk* gene

二、緣由與目的

苯乙烯(styrene) (CAS No.100-42-5) 是無色或淡黃色的液體，為一廣泛使用於塑膠、樹脂、塗料等工業的化學品。在致癌動物實驗中未能證實 styrene 的致癌性，然而 styrene 在體內會被代謝活化成環氧苯乙烯(styrene oxide; SO)，SO 為一已知的動物致癌物與可能人類致癌物，因此 styrene 對人體健康的影響仍備受關切。澳洲、比利時、芬蘭、瑞士、英國和美國設定勞工暴露在 styrene 環境中之標準為 100 ppm (Scandinavian, 1979)。我國行政院勞工委員會公告之勞工作業環境空氣中有害物質容許濃度標準，styrene 暴露之時量平均容許濃度(PEL-TWA)為 50 ppm (行政院勞工委員會, 1995)。

大鼠體內參與 styrene 代謝為 SO 的主要 CYP-450 酵素為 CYP 2E1、CYP

2B1、CYP1A 1/2 與 CYP 2C11；在人體中主要 CYP-450 酵素為 CYP 2E1、CYP 2B6、CYP 1F1 等(Gadberry *et al.*,1996)。動物致癌實驗已證實餵食 SO 會造成老鼠產生胃癌(forestomach tumors) (Lijinski, 1986)，而皮膚接觸 SO 會造成皮膚癌。SO 在 1994 年被 IARC (International Agency for Research on Cancer)歸類為 2A group 致癌物，即動物實驗已被證實會造成癌症，但是人類流行病學調查還沒有足夠證據顯示會致癌。

SO 具有 R 型(R-SO)或 S 型(S-SO)的光學異構物，在 *Salmonella typhimurium* TA100 中 S-SO 對細菌的毒性比 R-SO 大 (Pagano *et al.*,1982, Seile, 1990)。Gadberry 等人指出 R-SO 處理的老鼠，其肝臟因細胞毒性所釋放出來的酵素其活性比 S-SO 組高，此顯示 R-SO 對肝臟產生的毒性大於 S-SO (Gadberry *et al.*,1996)，與細菌之毒性結果恰巧相反。

SO 在體內可進一步被代謝而失去活性，主要由 glutathione S-transferase (GST) 酵素代謝而生成硫醇酸 (mercapturic acid)，或由 epoxide hydrolase (EH) 酵素代謝而生成苯乙烯甘油 (styrene glycol) 或苯乙醇酸(mandelic acid; MA)，再隨著尿液排出體外。先前的研究報告指出 GST 與 EH 對 SO 光學異構物有選擇性的偏好，推測 R-SO 與 S-SO 可能產生不同的細胞毒性與突變性。老鼠肝臟細胞質(cytosol)與 SO 反應後，測試 SO 光學異構物與 GSH 的鍵結物，結果顯示 R-SO 與 GST 酵素的結合能力約為 S-SO 的 1.8 倍(Hiratsuka *et al.*,1989)。然而 Foureman 於 1988 年利用 [¹⁴C]SO 處理肝臟微粒體，測量 SO 與肝臟中 GST 的鍵結物，卻發現 R-SO/S-SO 的比例為 0.65 (Foureman *et al.*,1988)。SO 除了經由 GST 進行去毒性作用外，還會經由 EH 進行水解，學者在 EH 酵素對 SO 光學異構物之結合能力也有不同的看法。

1982 年 Pagano 等人利用 *Salmonella typhimurium* TA100 進行 Ames test 顯示，R-SO 致突變率高於 S-SO，而(R+S)-SO 之

突變性介於兩者中間(Pagano *et al.*,1982)。老鼠骨髓細胞中觀察 CA 與 SCE 之情形顯示，S-SO 的致突變性大於 R-SO (Sinsheimer *et al.*,1993)。在細胞株(Chinese hamster V79)方面之研究顯示：S-SO 造成 SCE 的頻率高於 R-SO (von der hude *et al.*,1992)。

hprt 基因位於 X 染色體上，因此只要在 *hprt* 基因上發生單一突變就可以被選擇性試劑 (6-Thioguanine) 偵測出來，而因為 *hprt* 基因不是細胞生長的必需基因 (essential gene)，為偵測突變之良好標的基因。*tk* 基因因為突變位置不同，導致生長速度的表現也不同，第一種為 *tk* 基因突變後，細胞生長比較快之型態 (*tk-fast growing mutants*; *tk-fast*)，其所測得之突變率為點突變或小段基因缺失或嵌入；另一種 *tk* 基因突變會使 *tk* 基因的兩旁 (flanking) 造成缺失，使得細胞長的比較慢 (*tk-slow growing mutants*; *tk-slow*)，主要可以測得 DNA 大片段的缺失 (deletion)。*tk* 基因的突變很容易被 Trifluorothymine deoxyriboside (TFT) 選擇性試劑所篩選。*tk* 基因能夠測量非常廣泛的突變，包括點突變與嚴重的染色體改變或對偶基因的缺失 (allele loss)，可以說是一個良好的基因指標 (Honma *et al.*,1997)。

綜合前人之研究結果顯示，SO 光學異構物在不同生物種類中，其扮演的致毒性與致突變的角色可能會有所差異，而且不同研究對不同 SO 光學異構物所造成的細胞毒性與致突變性看法並不一致。本研究首次以人類淋巴母細胞 (human lymphoblastoid cell line; TK6) 來探討 SO 光學異構物在人類細胞的致細胞毒性與致突變性。利用 TK6 細胞生長情形與細胞群落形成能力來測試細胞毒性，並且使用 *hprt* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase) 基因與 *tk* (thymidine Kinase) 基因為標的基因進行突變性的測試，這些結果有助於進一步瞭解 SO 與其光學異構物對人類淋巴球細胞之相對致細胞毒性與致突變性。

三、結果與討論

3.1. SO 與 SO 光學異構物對 TK6 細胞之毒性

a. 細胞生長恢復情形(growth delay)

以不同劑量 (60、120、160 與 180 μM) 的 R-SO、S-SO 與 (R+S)-SO 處理 TK6 細胞經 24 小時，每日計算細胞生長倍數，在細胞培養 48 小時後，control 組細胞增加為原來 7.36 倍，依暴露劑量增加，細胞有生長遲緩之現象，顯示有劑量反應關係 (圖 1)。SO 與其光學異構物對 TK6 細胞之毒性顯示，R-SO、S-SO 與 (R+S)-SO 三者間對 TK6 細胞之毒性沒有達到統計上之顯著差異。

b. 細胞群落形成能力(PE)

利用細胞群落形成能力(PE)試驗顯示，隨著 R-SO、S-SO 與 (R+S)-SO 劑量的增加，所引發的細胞毒性也隨著增加，而且呈現劑量反應關係。以 120 μM 濃度之 R-SO、S-SO 與 (R+S)-SO 處理 TK6 細胞，其細胞相對存活率依次為 50.55、56.25 與 51.24% (圖 2)。由以上結果顯示，三者間對 TK6 細胞的毒性結果並無差異，此結果與細胞生長恢復情形之結果相似。

先前研究顯示以 200 μM SO 處理 V79 細胞株 3 小時，其細胞存活率接近 100%，顯示在此劑量下，SO 對 V79 細胞株並沒有造成毒性 (Nish *et al.*,1984)。而以 200 μM 的 SO 處理人類周邊淋巴球細胞 24 小時，其細胞存活率約為 40% (Bastlova *et al.*,1995)。本實驗以 180 μM 的 (R+S)-SO 處理 TK6 細胞經 24 小時，細胞存活率為 13%。由以上之結果顯示，TK6 細胞對 SO 造成之細胞毒性比 V79 細胞與人類周邊淋巴球細胞靈敏度高。

3.2. SO 與 SO 光學異構物對 TK6 細胞之致突變性

a. *hprt* 基因突變率

TK6 細胞之 *hprt* 基因突變率隨 SO 暴露劑量 (60、120 與 180 μM)，*hprt* 基因的突變率有增加之趨勢 (圖 3)。在 120 μM 濃度下 R-SO、S-SO 與 (R+S)-SO 所引發 *hprt* 基因的突變率分別為 25.1×10^{-6} 、 24.1×10^{-6} 與 35.0×10^{-6} 。R-SO 與 S-SO 對 TK6 細胞之突變機率有劑量反應關係，而且 S-SO 之整體突變機率有高於 R-

SO 之趨勢，但並沒有達到統計上之顯著不同。Sinsheimer 於 1993 年對老鼠骨髓細胞之 SCE 頻率與 CA 測試，結果顯示 S-SO 的突變率大於 R-SO (Sinsheimer *et al.*, 1993)。Nish 指出，SO 為一種弱致突變物質 (Nish *et al.*, 1984)，100 μM 處理 V79 細胞 3 小時，*hprt* 基因突變率增加為原來的 $<1 \times 10^{-6}$ (Nish *et al.*, 1984)。Bastlova 於 1995 年之結果顯示，SO 在 100 μM 劑量下，誘發人類周邊血液淋巴球細胞之突變率為 11.3×10^{-6} ，約為 control 的 1.5 倍。以上結果顯示 SO 對 TK6 細胞所造成致突變率比 V79 細胞與人類周邊血液淋巴球細胞高出很多，因此 SO 是否為弱致突變物質仍有待進一步證實。

b. *tk-fast* 基因突變率

TK6 細胞的 *tk-fast* 基因之突變率隨著 SO 劑量增加，*tk-fast* 基因突變機率也增加 (圖 4)，呈現良好劑量反應關係，但是彼此間沒有達到統計上之顯著差異 ($p>0.05$)。Von der Hude 於 1992 年發現，以 S-SO 誘發 Chinese Hamster V79 細胞株產生 SCE 的頻率雖然略高於 R-SO，但是並沒有達到統計上之顯著差異。Watabe 於 1981 年以 Ames test 對細菌之測試也發現 R-SO 與 S-SO 的致細胞突變率沒有差異 (Watabe *et al.*, 1981)。

c. *tk-slow* 基因突變率

在 TK6 細胞中 *tk-slow* 之基因突變率隨著 SO 劑量增加呈現良好劑量反應關係。在 120 μM 劑量作為比較，R-SO 引發 *tk-slow* 基因之突變率為 41.1×10^{-6} ，S-SO 為 28.0×10^{-6} ，(R+S)-SO 為 31.7×10^{-6} ，而 180 μM 劑量下 R-SO 之突變率為 89.5×10^{-6} ，S-SO 為 66.0×10^{-6} ，(R+S)-SO 為 78.2×10^{-6} (圖 5)。*tk-slow* 基因之突變率明顯高出 *tk-fast* 基因，*tk-slow* 基因突變率與細胞毒性有相同趨勢 (R-SO \geq S-SO)，雖然都沒有達到統計上之顯著意義，而 *tk-slow* 基因突變率主要在測試較大段的基因突變或缺損，因此顯示較大段基因突變 (*tk-slow* 基因) 率比 *hprt* 或 *tk-fast* 基因的突變率高。雖然只要發生突變都會使 *hprt* 酵素或 *tk* 酵素功能喪失，但是因為在 *tk* 基因旁邊有許多生長必須之基因，因此 SO 與其光學異構物對 TK6 細胞所造成大段基因缺損之情況，可能比點突變或小段基因缺損之影響較大。

d. *tk-total* 基因突變率

在 TK6 細胞中 *tk-total* 之基因突變率隨著 SO 劑量增加呈現良好劑量反應關係。以 120 μM 的劑量作為比較，R-SO 引發 *tk-total* 基因之突變率為 64.1×10^{-6} ，S-SO 為 55.2×10^{-6} ，(R+S)-SO 為 57.8×10^{-6} ，而 180 μM 劑量下 R-SO 之突變率為 123.6×10^{-6} ，S-SO 為 87.8×10^{-6} (圖 6)，(R+S)-SO 為 119.5×10^{-6} 。在三次獨立實驗中的結果顯示，在 60、120 與 180 μM 三種劑量測試中 R-SO 之突變率都比 S-SO 高，但是沒有達到統計上之顯著差異。

四、計畫成果自評

本年度的計劃研究成果報告已著手撰寫相關實驗結果的文章準備投稿國外期刊，本實驗選擇 *hprt* 基因與 *tk* 基因作為指標基因，以測試 SO 光學異構物之致突變性，希望能將具有基因突變之細胞收集，日後將進一步分析 DNA 序列以建立突變圖譜，探討 SO 誘發 *hprt* 基因突變之主要突變位置與所發生的突變種類，以進一步瞭解 SO 與其光學異構物之分子突變機制。

鑑於體外培養細胞與動物體內的生理環境因子可能不同，體外實驗結果不一定能代表動物的效應。我們正著手進行研究這兩種 SO 光學異構物於老鼠體內誘發基因損傷與突變的差異性，希望藉此進一步探討 SO 可能致癌的機制。

五、參考文獻

1. 中國醫藥學院環境醫學研究所 89 學年度碩士班研究生賴珊湖碩士畢業論文”苯環氧乙烷光學異構物對人類淋巴母細胞致毒性與致突變性之研究”。
2. Bastlova, T., Vodicka, P., Peterkova, K., Hemminki, K., Lambert, B. (1995) styrene oxide-induced HPRT mutations, DNA adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 16(10), 2357-62.
3. Cochrane, J.F and Skopek, T.R. (1994) Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2-epoxybutene, 1,2,3,4-diepoxybutane and 3,4-epoxy-1,2,-butanediol in cultured human lymphoblasts. *Carcinogenesis*. 15(4), 713-717.

4. Foureman, G.L., Harris, C., Guengerich, F.P. and Bend, J.R. (1988) Stereoselectivity of styrene Oxidation in Microsomes and in Purified Cytochrome P-450 Enzymes from Rat Liver. *The Journal of Pharmacology and Experiment Therapeutics*, 248(2), 492-497.
5. Gadberry, M.G., DeNicola, D.B. and Carlson, G.P. (1996) Pneumotoxicity and hepatotoxicity of styrene and styrene oxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 48(3), 273-94.
6. Hiratsuka, A., Yokoi, A., Iwata, H., Watabe, T., Satoh, K., Hatayama, I. and Sato, K. (1989) Glutathione conjugation of styrene 7,8-oxide enantiomers by major glutathione transferase isoenzymes isolated from rat livers. *Biochemical Pharmacology*. 38(24), 4405-4413.
7. Honma, M., Hayashi, M. and Sofuni T. (1997) Cytotoxic and mutagenic responses to X-rays and chemical mutagens in normal and p53-mutated human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*. 374, 89-98
8. Nishi, Y., Hasegawa, M.M., Taketomi, M., Ohkawa, Y. and Inui, N. (1984) Comparison of 6-thioguanine-resistant mutation and sister chromatid exchanges in chinese hamster V79 cells with forty chemical and physical agents. *Cancer research*. 44, 3270-3279.
9. Pagano, D.A., Yagen, B., Hernandez, O., Bend, J.R., Zeiger, E. (1982) Mutagenicity of (R) and (S) styrene 7,8-oxide and the intermediary mercapturic acid metabolites formed from styrene 7,8-oxide. *Environmental Mutagenesis*, 4(5), 575-84.
10. Scandinavian Expert group on limit value documentation -styrene. (1979) *Arbete Och Halsa*, 14, 36.
11. Seiler J.P. (1990) Chirality-dependent DNA reactivity as the possible cause of the differential mutagenicity of the two components in an enantiomeric pair of epoxides. *Mutation Research*. 245:168-169.
12. Von der hude, W., Carstensen S., Gurtler R., Gunter O. (1992) Structure-activity relationships of epoxides: induction of sister-chromatid exchanges in V79 cells by enantiomeric epoxides. *Mutation Research*. 278:289-297.
13. Watabe, T., Ozawa, N. and Yoshikawa, K. (1982). Studies on metabolism and toxicity of styrene. V. The metabolism of styrene, racemic, R-(+), and S-(-)-phenyloriranes in the rat, *Journal Pharmacobio-Dyn*. 5, 129-133.
14. 行政院勞工委員會 (1995). 勞工作業環境空氣中有害物質容許濃度標準.

圖1. 180 μ M SO 與 SO 光學異構物誘發 TK6 細胞之生長遲緩現象

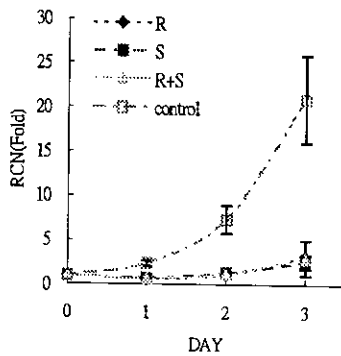


圖 4. SO 與 SO 光學異構物對誘發 TK6 細胞 *tk fast* 基因突變率

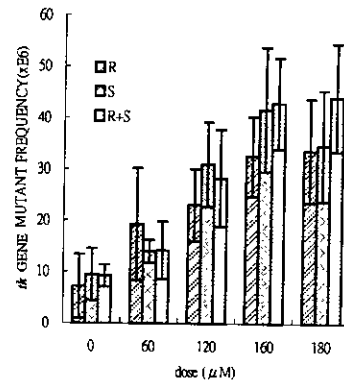


圖2. 細胞群落形成能力 (PE) 評估 SO 與 SO 光學異構物對 TK6 細胞之毒性

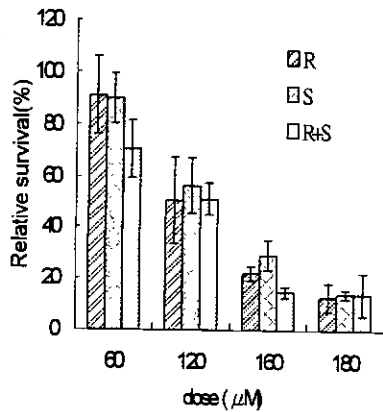


圖 5 SO 與 SO 光學異構物對誘發 TK6 細胞 *tk slow* 基因突變率

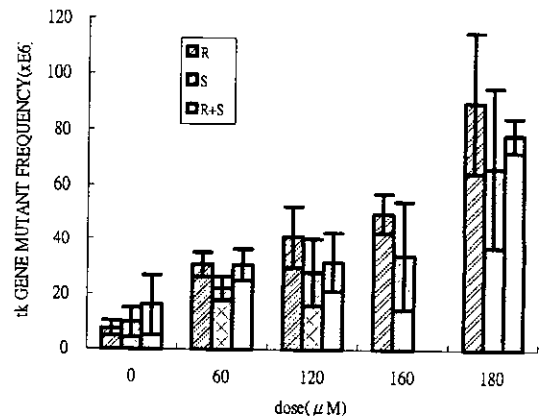


圖3. SO 與 SO 光學異構物誘發 TK6 細胞 *hprt* 基因突變率

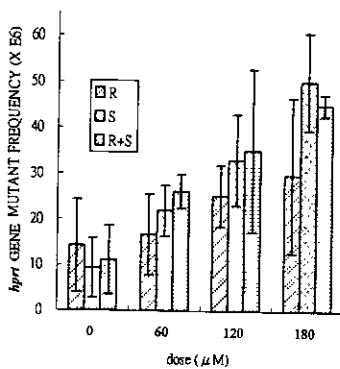


圖 6. SO 與 SO 光學異構物對誘發 TK6 細胞 *tk total* 突變率

