行政院國家科學委員會補助

大專學生研究計畫研究成果報告

＊ ********* ** ＊
＊ 計 畫 ： 名 稱 綠茶飲用、微型核醣核酸-29b（MicroRNA-29b）與其標的基因 DNA 甲基轉移?3B（DNMT3B）表現量對於肺癌發生之效應 ＊
＊ ********* ** ＊

執行計畫學生： 林潔麗
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-038-B
研 究 期 間 ： 101 年 07 月 01 日至 102 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授 ： 翁瑞宏

處理方式： 本計畫可公開查詢

執 行 單 位： 中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 102 年 03 月 29 日

摘要：

肺癌 (lung cancer) 與抽菸之相關性已經被清楚地建立，而茶多酚 (tea polyphenols) 是種強抗氧化物，可能預防癌症的發展，但是其確實機制仍不清楚。在腫瘤中，DNA 甲基化轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMT]) 具有高度表現；而微型核醣核酸 (microRNA [miR]) -29b 能夠向下調節 DNMT 的活性，進而降低腫瘤的發生。特別的是，抽菸和茶多酚可能藉由調控 miR-29b 表現來影響 DNMT3B。因此，我們設計一項病例對照研究來評估抽菸、綠茶飲用、miR-29b 與其標的基因 DNMT3B 表現對於肺癌發生危險的效應。總計，有 71 名病例與 71 名對照被納入本研究，人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜、實際烹煮情形、以及肺癌家族史是由問卷訪視所獲得；血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量是以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 來判定。結果顯示，健康對照之抽菸者相較於無抽菸者具有顯著較低的 miR-29b 表現量。在調整干擾因子的效應後，相較於 miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者，合併其他 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現分組者具有 3.36 倍 (95% C.I. = 1.11-10.17) 的顯著肺癌發生危險性；但是，血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險並未具有顯著的交互作用。此外，抽菸狀況也分別與血液 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性具有顯著的交互作用，並且綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用。然而，綠茶飲用與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險並沒有顯著的合併效應。我們的結果建議著，抽菸可能減少 miR-29b 的表現；而具有 miR-29b 低度表現以及 DNMT3B mRNA 高度表現之抽菸者，以及 DNMT3B mRNA 高度表現的未飲用綠茶者是更容易具有肺癌的發生。

關鍵字：肺癌、抽菸、綠茶、miR-29b、DNMT3B。

前言：

香菸包含數千種化合物，其中很多是已知或者是疑似人類致癌物 [1, 2]；重要的是，肺癌與抽菸之穩定相關已經被廣泛地建立。實際上，香煙的焦油 (tar) 部分已經被顯示是苯醌 (quinone)/對苯二酚 (hydroquine) 氧化還原反應的複雜混合物 [3-5]，具有催化產生過氧化陰離子的能力；氣態煙則包含穩定濃度的游離基，可導致氮氧化物對於在煙流中之低分子量碳氫化合物引動自發性氧化反應 [6]。因此，氧化物/抗氧化物間的不平衡可能在個人暴露於香煙之肺癌致癌機制上具有一定的角色。茶已經受到極大地關注，因為茶多酚是種強抗氧化物，並且茶品已經顯示出對抗腫瘤發展的抑制能力 [6, 7]。在不同的實驗動物模式中，綠茶也被觀察到可以抑制多種致癌性物質所引發的肺癌腫瘤之形成，包括 N-nitrosodiethylamine 和 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) [7]。此外，綠茶多酚可以防止暴露於紫外線 UVB 輻射之無毛的 SKH-1 雌性小鼠的脂質過氧化物形成 [8]；並且，綠茶多酚也可以抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 (apoptosis) [9, 10]。然而在目前，對於茶多酚在癌症之確實抑制效應仍然不清楚。

表觀遺傳 (epigenetic) 為核酸序列並未改變，但卻改變了基因的表現型態；表觀遺傳修飾包括 DNA 甲基化 (methylation)、組織蛋白 (histone) 修飾、以及核小體定位 (nuclesome positioning) [11]。DNA 高度甲基化是表觀遺傳機制對於許多基因默化 (silencing) 的關鍵，包括相關於細胞週期的調節 (cell cycle regulation)、接受體 (receptors)、DNA 修復 (DNA repair)、與細胞凋零的基因 [12, 13]。在基因啟動子區域上的 DNA 序列發生了甲基化修飾作用，尤其是在 CpG 相連的核酸序列，主要是利用 S-adenosyl-methionine (SAM) 做為甲基的提供者，

再以 DNA 甲基轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMT]) 當作催化劑；DNMT 利用半胱胺酸 (cysteine) 與 DNA 鹼基胞嘧啶 (cytosine) 上第六個碳結合，造成鄰近第五個碳吸引 SAM 上的甲基結合以形成 5’-methylcytosine [14]。在哺乳動物中，DNMT 可被區分為 DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B、與 DNMT3L 五種 [15]。DNMT1 為決定 DNA 甲基化的酵素，並且導致基因默化；DNMT2 的活性較弱，但是仍具有影響力；DNMT3A 與 DNMT3B 參與 DNA 重新甲基化作用，而 DNMT3L 雖然不具有催化 DNA 甲基化的功能，但能夠將 DNMT3A 與 DNMT3B 去活化。在腫瘤中，已經觀察到 DNMT1 與 DNMT3B 的活性具有增加的情形 [16, 17]。有趣的是，先前研究也指出茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 在不同組織或癌症細胞中能夠有效地抑制 DNMT 的活性，進一步地可能降低腫瘤的發生 [15, 18]。

微型核醣核酸 (microRNA [miRNA]) 是一段長約 20-22 個核苷酸，結構上是長髮夾型的單股 RNA 分子 [19]。miRNA 可經由類似 RNA 干擾 (RNA interference [RNAi]) 的機制將 RNA 降解，也可以鍵結在目標 mRNA 的 3’端非編碼區 (untranslated region [UTR])，以抑制 mRNA 的轉譯 [20]。miR-29 家族，可分為 miR-29a、miR-29b、以及 miR-29c；有趣的是，miR-29b 可以減少 DNMT3 家族的活性，並且會直接標的鍵結在 DNMT3A 與 DNMT3B 的 3’UTR 端，進而使已被甲基化而默化的抑癌基因 (tumor suppressor genes) 再表現以及改變細胞凋亡的影響 [21, 22]。

重要的是，茶多酚可在癌症細胞中抑制 DNMT3B 的表現 [15, 18]；一項最近的研究也在 apoE 基因剔除的小鼠中觀察到，多酚可反向調控受到 apoE 突變所影響的 miR-29 表現，並使之回復正常 [23]。因此，我們有興趣探討抽菸、綠

茶飲用、miR-29b 與其標的基因 DNMT3B 表現和肺癌發生的相關。

材料與方法：

研究對象

在我們的研究過程中，對於病患與健康參與者的實驗以及病患的個案史都是符合赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki)，並且獲取所有研究對象的書面同意書，研究設計並由參與本研究之機構的倫理委員會 (institutional review board) 所批准。總計，71 位原發性肺癌 (國際疾病分類第 9 版；ICD9 代碼 162) 病患是從台中澄清醫院與童綜合醫院被納入至本研究中，全部病例也由合格的病理學家執行一系列的病理階段檢查；腫瘤的類型和階段也依據世界衛生組織 (World Health Organization) 的分類方式來決定 [24]；其中 52 名 (73.0%) 為肺腺癌 (adenocarcinoma) 以及 14 名 (19.7%) 為鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma)。同時，71 位潛在的對照是從不具癌症病史的病患中隨機選取，他們是在相同的教學醫院執行身體檢查。

流行病學資料

結構式問卷所涵蓋的問題包括：人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜、實際烹煮情形、以及肺癌家族史。研究對象的抽菸史包括每天抽菸的支數和抽菸年數；累積抽菸量是以抽菸包年計算，亦即每天的包數乘以抽菸的年數。水果及蔬菜的攝取也從當地普遍可獲得並且一般被攝取的種類中，計算出最近三年前的每週標準化平均餐數。肺癌家族史，則是定義為研究對象之一等親親屬具有肺癌。此外，過去家戶的烹飪暴露也被評估；研究對象被詢

問關於各種烹飪方法的使用頻率，特別是他們平常的炒菜方式。

在台灣，茶壺裝盛每批茶葉的乾重約為 3-5 克，再倒入熱水沖泡 (約 150-250 毫升)，並且不加入任何的糖或牛奶等添加物，從茶壺沖泡出來的茶再倒入茶杯中飲用。通常沖泡的第一泡茶液會快速地被倒出不飲，第二泡約浸泡 2-3 分鐘後倒出，第三、四泡則約浸泡 5 分鐘後倒出飲用；同一批茶葉大約會回沖 3-4 次。在台灣用來飲茶的茶杯體積較小 (30-50 毫升)，故在面訪時依研究對象所描述之飲茶量轉換成標準容器的體積量 (100-120 毫升)。在我們的研究中，關於綠茶飲用的調查分為幾個回應做為分類。首先研究對象被詢問是否有飲用綠茶，回應為“曾經飲用綠茶者”則進一步地被詢問飲用綠茶量以及飲用綠茶年數。綠茶飲用的頻率則是從五個可能得到的答覆去評估，即每天一杯以上、一週三到四杯、一週一到二杯、以及一個月一到二杯或更少；接續詢問習慣飲用綠茶的年數。對於每天飲用綠茶者，每天所飲用的杯數被進一步地確認。我們也針對問題的答覆，根據先前的一項追蹤研究，區分成五項類別：每天少於一杯、每天一至二杯、每天三至四杯、每天五至九杯、以及每天十杯以上 [25]。為了避免個人在疾病診斷後改變其飲茶習慣而造成對於飲茶攝取的錯誤分組 (misclassification)，我們僅收集在疾病發生前的累積量。在本研究中，綠茶飲用是根據一項先前的研究來評估的 [26]，該研究使用問卷以及根據一年內三天的飲食紀錄來評估綠茶飲用量，兩者間的斯皮爾曼相關係數 (Spearman’s correlation coefficient) 為 0.66；並且藉由兩份問卷評估相隔六個月前後之綠茶飲用量，兩者之間的斯皮爾曼相關係數也為 0.66。因此，問卷可能導致無差異性的錯誤分組，因而造成結果被低估。以類似的方法來評估綠茶飲用也在其他的研究中被運用 [26, 27]，這意味著此評估方法具有一定的效度。此外，不管是病例還是對照，他們都對於本研究要探討綠茶

飲用的目的並不清楚；因此，參與者是不太可能在綠茶飲用的資訊上產生偏差。

RNA 萃取

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，而這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C 下。RNA 的萃取是從血液樣本抽離出 buffy coat 並置於微量離心管中，加入 1 ml TRIzol 試劑後，靜置冰上 20 分鐘，再加入 200 μl DZPC-氯仿混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，將上清液移置新的微量離心管；再加入 500 μl 之 99% isopropanol，混合均勻後置於-20°C 下 10 分鐘。再於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，移去上清液，並且加入 1 ml 75%之 RNA-ethanol 混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘，移去上清液；待 RNA 沉澱物乾燥後，加入無 RNase 之去離子水將沉澱物溶解。接著進行 RNA 定量：將 RNA 以 DEPC-treated water 稀釋 25 倍，使用分光光度計在 260 nm 與 280 nm 波長下測量總 RNA 的濃度 (比值需大於 1.8)，吸光值即為 RNA 濃度 (μg/μl)。

miR-29b 與 DNMT3B mRNA 之反轉錄與即時定量聚合酶鏈鎖反應

TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems，CA，USA) 被應用於定量 miR-29b。首先進行反轉錄 (reverse transcription [RT])，取 5 μl 待測之 miRNA 加入 0.15 μl dNTP、1.0 μl RTase、1.5 μl 10x RT buffer、0.19 μl RNase 抑制劑、3 μl 5x RT 引子、以及 4.16 μl 無 Nuclease 之去離子水；miR-29b 引子分別為 forward：5’-GCT GGT TTC ACA TGG TGG C-3’與 reverse：5’-AAC ACT GAT TTC AAA TGG TG-3’，反應條件如下：16°C 30 分鐘、42°C 30 分鐘、85°C 5 分鐘。反應完

畢後補上 5 μl 無 Nuclease 之去離子水，以進行後續的聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction [PCR])。取 5 μl 反轉錄後的 cDNA，加入 1 μl 20x 引子、10 μl 2x Master Mix、以及 4 μl 無 Nuclease 之去離子水置於 96 孔盤中並進行二重複。以 RNU6B 當作內部對照，RNU6B 引子分別為 forward：5’-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3’與 reverse：5’-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3’；PCR 循環條件為 95°C 15 分鐘、95°C 15 秒、60°C 1 分鐘，共 40 回合。進行 PCR 的儀器是使用 ABI PRISM 7000 Real Time RT-PCR System and TaqMan Gene Expression probe (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。在 PCR 的過程中，當螢光訊號超過閥值時，此時的循環數則被認定為循環閥值 (cycle threshold [Ct])；而公式 $2^{-\Delta Ct}$ 可應用於計算 miR-29b 在血液中的相對表現量，ΔCt = Ct (待測基因)-Ct (對照基因)。

DNMT3B mRNA 之反轉錄反應是使用 RT-PCR kit (Promega) 所進行，取 2 μg 的總 RNA 加熱 70°C 10 分鐘後，隨即放置冰浴中冷卻 2 分鐘，再加入 4 μl 的 5 倍 MMLV buffer、2 μl 的 10 mM dNTP、0.5 μl 的 recombinant RNasin Ribonuclease 抑制劑 (40 U/μl)、0.5 μl 的 MMLV Reverse transcriptase RNase H(-)point mutant、1 μl 的 Random 引子 (500 ng/μl)、以及無 RNase 之去離子水補至最終體積為 20 μl。於 PCR 儀器中進行下列反應：42°C 90 分鐘、72°C 10 分鐘、4°C 5 分鐘來合成 cDNA，儲存於-20°C 下備用。使用 standard SYBR Green PCR kit 進行 DNMT3B 定量分析，DNMT3B 引子分別為 forward：5’-TAT CCG CAC CCC GGA GAT-3’與 reverse：5’-ATC GCC TGT CAA GTC CTG TGT-3’。寡核苷酸藉由 TIB Molbiol Inc 形成，每管反應物包含了 25 μl Fast Start TaqMan Probe Master、0.5 μl UPL 探針、0.5 μl forward 引子、0.5 μl reverse 引子、18 μl 無 Nuclease 之去離子水、以

及 5 µl RNA。使用 GAPDH 當作內部對照，使加入 PCR 反應中的不同 cDNA 總量可以標準化；GAPDH 的放大使用 UPL Reference Gene Assays，反應物含有 10 µl FastStart TaqMan Probe Master、0.5 µl 探針、0.5 µl 引子混合物、以及 4 µl 無 Nuclease 之去離子水。GAPDH 引子分別為 forward：5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC-3'與 reverse：5'-GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT-3'。PCR 反應開始於 42^{o}C 5 分鐘、95 ^{o}C 3 分鐘；接下來進行 40 回合循環：95^{o}C 3 秒、69^{o}C 30 秒；根據 Ct 值來計算待測之 DNMT3B mRNA 的相對表現量。

統計分析

病例組與對照組的性別、收案時之年齡、抽菸狀況、抽菸包年、綠茶飲用量、蔬菜與水果的攝取量、過往烹煮的暴露、肺癌家族史，若為連續性變項以平均值 ± 標準差表示，並以 Student's *t*-test 進行檢定；若為類別性變項則以個數與百分比呈現，以 χ^2-test 或 Fisher's exact test 檢定兩組之分佈。以 Kolmogorov-Smirnov test 檢定 miR-29b (*P* = 0.010) 與 DNMT3B mRNA (*P* = 0.010) 表現量之分佈，結果呈現為非常態分佈；因此，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量在各變項間之分層中，則以中位數 (最小值-最大值) 來呈現，並且以 Wilcoxon rank-sum test 或 Kruskal-Wallis test 進行分析。隨後，依據對照組其 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現之第三分位數區分為高度表現與低度表現兩組，並且使用邏輯斯迴歸模式 (logistic regression model) 求取每個變項的危險對比值 (odds ratio [OR]) 以及 95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.])。另外，在不同的抽菸狀況以及綠茶飲用狀況分層中，分別檢定 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現程度對於肺癌發生危險之交互作用，交互作用是藉由概似比檢定 (likelihood ratio test) 以計算 χ^2

值與 p 值；在交互作用的檢定中，將僅具有主效應項 (main effects terms) 的邏輯斯迴歸模式與同時具有主效應項和交互作用項 (interaction term) 的模式進行比較。所有的 P 值皆以雙尾檢定來計算，並且以 $P < 0.05$ 定義為顯著性，全部數據以 SAS 9.2 來分析。

結果：

總計 142 名研究對象參與本研究，年齡範圍從 23 歲至 94 歲，其特徵整理於表一。在研究對象中，男性的比例為 60.6%，女性為 39.4%；肺癌病患的平均年齡為 63.6 歲，對照為 52.6 歲，並且在兩組間具有顯著差異 ($P < 0.001$)。相較於健康對照，有 26.8%的病患抽菸超過 40 包年，而在對照組中是 8.4% (OR = 4.16；95% C.I. = 1.50-11.52)。然而，飲用綠茶、蔬果攝取、炒菜油煙、以及肺癌家族史在病例與對照組間的分佈並沒有顯著差異。

miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量在肺癌病患與對照的人口學分組中之分佈，分別呈現於表二以及表三；由於 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量呈現非常態分佈，因此其數值在此以中位數 (最小值-最大值) 來呈現。我們的肺癌病例相較於健康對照在年齡 ≤50 歲者 ($P = 0.028$，Wilcoxon rank-sum test) 以及無抽菸者 ($P = 0.003$) 中，分別具有顯著較低的 miR-29b 表現量；並且在健康對照中，有抽菸習慣者相較於無抽菸習慣者也具有顯著較低的 miR-29b 表現量 (42 vs. 128；$P = 0.043$)。在肺癌病例中，抽菸者相較於無抽菸者具有顯著較高的 DNMT3B mRNA 表現量 (41 vs. 23；$P = 0.041$)。而在抽菸 1-39 包年 ($P = 0.066$) 以及未飲用綠茶者 ($P = 0.052$) 者中，肺癌病例相較於對照則分別具有較高的 DNMT3B mRNA 表現量。此外，未飲用綠茶的肺癌病例相較於每天飲用綠茶小於 1 杯或

大於 1 杯的肺癌病例也具有較高的 DNMT3B mRNA 表現量 (51 vs. 24 vs. 24；*P* = 0.067，Kruskal-Wallis test)；同樣地，未飲用綠茶的肺癌病例相較於飲用綠茶少於等於 10 年以及大於 10 年的肺癌病例也具有較高的 DNMT3B mRNA 表現量 (51 vs. 24 vs. 20；*P* = 0.073)。在對照之中，有肺癌家族史者相較於無肺癌家族史者具有顯著較低的 DNMT3B mRNA 表現量 (10 vs. 30；*P* = 0.014)。然而，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量在不同的蔬果攝取與炒菜油煙分組間並未具有統計顯著差異。

隨後，我們評估 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生之合併效應 (表四)。以對照的 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量之第三分位數來區分為高度表現與低度表現，並以 miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者為參考組。在調整性別、年齡、與抽菸狀況的效應後，miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、以及 miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者分別相較於參考組具有 4.07 倍 (95% C.I. = 0.82-20.26)、4.11 倍 (95% C.I.= 0.60-28.08)、以及 2.45 倍 (95% C.I. = 0.57-10.59) 之肺癌發生危險性。進一步地，我們將 miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、以及 miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者，合併在一起以增加統計檢定力，他們相較於參考組也具有 3.36 倍 (95% C.I. = 1.11-10.17；*P* = 0.032) 的顯著肺癌發生危險。然而，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌的發生並不具有顯著的交互作用。

接續，我們分別評估抽菸狀況與 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用 (表五)。在調整性別與年齡的效應後，miR-29b 低度表現之抽菸者、miR-29b 高度表現之抽菸者、以及 miR-29b 低度表現之無抽菸者分別

相較於 miR-29b 高度表現之無抽菸者具有 9.17 倍 (95% C.I. = 1.52-55.34)、12.10 倍 (95% C.I. = 1.42-102.82)、以及 3.28 倍 (95% C.I. = 0.59-18.24) 之肺癌發生危險性；並且，抽菸狀況與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險具有顯著的交互作用 (*P* = 0.026)。同樣地，DNMT3B mRNA 高度表現之抽菸者、DNMT3B mRNA 低度表現之抽菸者、以及 DNMT3B mRNA 高度表現之無抽菸者相較於 DNMT3B mRNA 低度表現之無抽菸者分別具有 8.09 倍 (95% C.I. = 2.17-30.11)、2.54 倍 (95% C.I. = 0.88-7.37)、以及 1.06 倍 (95% C.I. = 0.32-3.52) 之肺癌發生危險性；並且，抽菸狀況與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用 (*P* = 0.017)。

最後，我們評估綠茶飲用分別與 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用 (表六)。在調整性別、年齡、與抽菸狀況的效應後，DNMT3B mRNA 高度表現之未飲茶者相較於 DNMT3B mRNA 低度表現之飲茶者具有 3.71 倍 (95% C.I. = 0.93-14.82) 之肺癌發生危險性；並且綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險具有顯著的交互作用 (*P* = 0.011)。然而，綠茶飲用與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險並沒有顯著的合併效應。

討論：

我們現今的研究發現，合併攜帶 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現者具有顯著較高的肺癌發生危險。此外，抽菸分別與 miR-29b 和 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌的發生具有顯著的交互作用；並且綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用。

原先一項於美國所執行的肺癌研究觀察到，miR-29 家族的表現與 DNMT3B

的表現是呈現負相關，並且 miR-29b 可以向下調控 DNMT 的表現 [21]。此外，在肺癌細胞株中，miR-29b 表現的增加可以減少全體基因甲基化以及恢復抑癌基因的表現，進而抑制腫瘤的發生 [21]。我們現今的結果顯示，年齡 ≤50 歲之肺癌病例相較於對照具有顯著較低的 miR-29b 表現；並且，年齡 ≥60 歲者也具有相同的情形，雖然如此的結果並未達到統計顯著性，而這可能是較少的樣本數所導致。此外，在無抽菸者中，肺癌病例相較於對照也具有顯著較低的 miR-29b 表現量。但是，我們觀察到抽菸者與無抽菸者的結果卻是相反的；這原因是有二名具抽菸習慣的對照 (抽菸包年數分別為 17 與 44) 具有較低的 miR-29b 表現量 (0.01 與 3.07)，若排除此二名對照，我們可以觀察到肺癌病例 (中位數 67.3) 相較於對照 (中位數 82.8) 仍具有較低的 miR-29b 表現。這也暗示著，此二名具抽菸習慣的對照雖未呈現疾病的發展，但仍具有疾病發展的危險傾向。香菸中的 NNK 已經被發現可以透過與 α7nAChR 結合以促使 α7nAChR 的活化，進而誘導在細胞質的 c-Src 被磷酸化 [28]，並且也會藉由此路徑將 β-catenin 蛋白活化 [29]。在細胞核中的 β-catenin 可與 TCF4 形成轉錄複合體 [30]，使得 c-Myc 蛋白能夠直接抑制 miR-29b [29]，而造成 DNMT3B mRNA 的表現增加，並且使抑癌基因的啟動子高度甲基化而造成基因默化，而導致肺癌的發生 [21]。因此，如同在我們的健康對照中，抽菸者相較於無抽菸者具有較低的 miR-29b 表現；並且，如此的表現可能是引起相關癌症發生的重要機制。另一方面，我們也在肺癌病例中觀察到，抽菸者相較於無抽菸者具有較高的 DNMT3B mRNA 表現。証據顯示 NNK 也可以透過 AKT 路徑而減弱 βTrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3β/βTrCP 蛋白降解體路徑去活化；也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，將 βTrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，並

且使抑癌基因的啟動子高度甲基化並造成基因默化，進而可能導致肺癌的發生[31]。因此，我們具有抽菸習慣的肺癌病例相較於無抽菸之肺癌病例具有較高的DNMT3B mRNA 表現。

我們將 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現區分為高度與低度表現，當合併攜帶 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現者，則相較於同時攜帶 miR-29b 高度表現和 DNMT3B mRNA 低度表現者具有顯著增加的肺癌發生危險；雖然，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性並未具有顯著的交互作用。此結果反映著相較於同時是 miR-29b 高度表現與 DNMT3B mRNA 低度表現者，只要具有一項 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現即可以增加罹患肺癌的危險性。然而，目前的樣本數仍是不足以偵測出 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生的交互作用。有趣的是，我們現今的研究也觀察到抽菸狀況與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險性具有明顯的交互作用。同樣地，抽菸狀況與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性也具有明顯的交互作用。如此的結果可能反映著具有 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現者具有較高的 DNA 甲基化程度；而抽菸者除了具有產生影響 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現的物質暴露外 (如 NNK)，尚有其他致癌成份的暴露或相關效應。因此，個體同時具有抽菸與 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現則可能更會增加肺癌的發生危險。

許多實驗研究顯示，綠茶可能抑制許多由物理性及化學性致癌物所引發的癌症 [7]；而與飲茶相關的潛在效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [32, 33]。茶多酚可以有效地清除自由基，可能預防致突變性和基因毒性，抑制腫瘤的起始、促進、以及細胞增生；調控去毒性酵素，並且清除致癌物的活化代謝產

物 [7, 34]。特別的是，茶多酚中的沒食子酸化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 在不同的癌症細胞中也顯示出能夠抑制 DNMT 的活性，進而可能降低腫瘤的發生 [15, 18]。而茶多酚可能透過兩種機制來參與抑制 DNA 的甲基化，一是茶多酚可以直接抑制 DNMT 的活性，另一則是茶多酚間接地藉由兒茶酚-O-甲基轉移酶 (catechol-O-methyltransferase) 來減少 SAM，導致 DNMT 作用被抑制。我們的研究觀察到沒有飲用綠茶的肺癌病例相較於健康對照具有較高的 DNMT3B mRNA 表現，雖然僅具有邊際顯著性；而飲用綠茶的肺癌病例與健康對照其 DNMT3B mRNA 表現則較低，並且兩者之間也不具有顯著差異。重要的是，綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性具有交互作用。如此的結果建議著未飲用綠茶者除了具有較低的預防突變性和基因毒性、甚至較低的清除自由基與致癌物的能力外，也對於 DNMT 與 DNA 甲基化具有較低的抑制能力。若個體同時具為 DNMT3B mRNA 為高度表現並且未飲用綠茶，則更可能會增加罹患肺癌的危險。然而，我們並未觀察到綠茶飲用與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險性的交互作用；這可能表示綠茶成份與 miR-29b 在肺癌發展的機制上可能較不具有關聯。此外，較少的樣本數可能也是造成如此結果的原因。在未來仍需要進一步的功能性研究，在肺癌的致病機轉上加以驗證我們現今所觀察到的結果。

許多研究已經觀察到蔬果的攝取對於肺癌的預防是有益的，大部分的證據傾向於蔬果攝取與肺癌呈現反向關係。但是，我們的結果顯示蔬果攝取與肺癌並沒有相關存在。可能的原因是利用問卷並無法準確地評估實際的蔬果攝取量，並且造成估計上的偏差；對於多數研究對象而言，估計特定種類的蔬果攝取量是有困難的。烹煮油煙的複雜成分中，芳香雜環化合胺 (aromatic heterocyclic amines) 是

主要的致癌物，並且與肺癌相關 [35]。然而，在我們的研究中，炒菜油煙每週暴露的時間對於肺癌發生危險並沒有相關存在，原因可能是樣本數太少所導致。另外，我們也詢問病例以及對照其肺癌家族史，並且病例相較於對照具有較高比例的肺癌家族史。這項結果顯示，肺癌的家族危險性可能是歸因於遺傳因子或是共同的環境因子。

對於血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現的測定，我們是以即時定量 PCR 進行二重複實驗，而二重複實驗所獲得的 Ct 值之差必須在 0.5 以內才能接受；因此，我們的實驗技術是具有良好的一致性。然而，在我們的研究中，大部分肺癌病患好發於較高年齡，我們並未找到與肺癌病患年齡合適配對的健康對照；因此，年齡在肺癌病患與健康對照之間具有著明顯的差異。此外，我們的研究對象個數較少；因此會限制血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌危險性相關判定的檢定力。因此，未來仍須增加研究對象的樣本數以及設計更有效的研究方法，來確立我們的結果。

總體而言，我們的結果建議著，抽菸者的 miR-29b 表現減少可能會增加 DNMT3B mRNA 表現，進而導致肺癌的發生。

致謝：

本研究感謝國科會 (101-2815-C-040-038-B) 的贊助，也感謝翁瑞宏老師、賴重佑醫師、王俊堯醫師、蔡慶宏醫師以及實驗室全體夥伴的協助。

參考文獻

1. Boyle P. Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. Lung Cancer.

12:167-81, 1995.

2. Hoffmann D. Djordjevic MV. Hoffmann I. The changing cigarette. Prev Med. 26:427-34, 1997.
3. Church DF. Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect. 64:111-26, 1985.
4. Pryor WA. Prier DG. Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. Environ Health Perspect. 47:345-55, 1983.
5. Pryor WA. Hales BJ. Premovic PI. et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. Science. 220:425-7, 1983.
6. Balentine DA. Wiseman SA. Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. Crit Rev Food Sci Nutr. 37:693-704, 1997.
7. Yang CS. Wang ZY. Tea and cancer. Natl Cancer Inst. 85:1038-49, 1993.
8. Vayalil PK. Elmets CA. Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. Carcinogenesis. 24:927-36, 2003.
9. Yang GY. Liao J. Li C. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H(2)O(2) production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. Carcinogenesis. 21:2035-9, 2000.
10. Yang GY. Liao J. Kim K. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. Carcinogenesis. 19:611-6, 1998.
11. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 358:1148-59, 2008.
12. Jones PA. Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat

Rev Genet. 3:415-28, 2002.

13. Jones PA. Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science. 293:1068-70, 2001.
14. Taby R. Issa JP. Cancer epigenetics. CA Cancer J Clin. 60:376-92, 2010.
15. Tang M. Xu W. Wang Q. et al. Potential of DNMT and its epigenetic regulation for Lung Cancer Therapy. Curr Genomics. 10:336-52, 2009.
16. Clark SJ. Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? Oncogene. 21:5380-7, 2002.
17. Saito Y. Kanai Y. Nakagawa T. et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. Int J Cancer. 105:527-32, 2003.
18. Fang MZ. Wang Y. Ai N. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. Cancer Res. 63:7563-70, 2003.
19. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116:281-97, 2004.
20. Filipowicz W. Bhattacharyya SN. Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 9:102-14, 2008.
21. Fabbri M. Garzon R. Cimmion A. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:15805-10, 2007.
22. Chen KC. Wang YS. Hu CY. et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for

cardiovascular disease. FASEB J. 25:1718-28, 2011.

23. Milenkovic D. Deval C. Gouranton E. et al. Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. PLoS One. 7:e29837, 2012.

24. Anonymous. Histological typing of lung tumors (2nd ed.). World Health Organization, Geneva, 1981.

25. Tsubono Y. Nishino Y. Komatsu S. et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. N Engl J Med. 344:632-6, 2001.

26. Jian L. Binns CW. Lee AH. Validity of a food-frequency questionnaire for elderly men in southeast China. Public Health Nutr. 9:928-33, 2006.

27. Ogawa K. Tsubono Y. Nishino Y. et al. Validation of a food-frequency questionnaire for cohort studies in rural Japan. Public Health Nutr. 6:147-57, 2003.

28. Shen J. Xu L. Owonikoko TK. et al. NNK promotes migration and invasion of lung cancer cells through activation of c-Src/PKCι/FAK loop. Cancer Lett. 318:106-13, 2012.

29. Rothschild SI. Tschan MP. Federzoni EA. et al. MicroRNA-29b is involved in the Src-ID1 signaling pathway and is dysregulated in human lung adenocarcinoma. Oncogene. 31:4221-32, 2012.

30. Tong X. O'Kelly J. Xie D. et al. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. Oncogene. 23:4847-55, 2004.

31. Lin RK. Hsieh YS. Lin P. et al. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. J Clin Invest. 120:521-32,

2010.

32. Wiseman SA. Balentine DA. Frei B. Antioxidants in tea. Crit Rev Food Sci Nutr. 37:705-18, 1997.

33. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. Proc Soc Exp Biol Med. 220:262-6, 1999.

34. Ahmad N. Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. Nutr Rev. 57:78-83, 1999.

35. Seow A. Poh WT. The M. et al. Fumes from meat cooking and lung cancer risk in Chinese women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9:1215-21, 2000.

表一：肺癌病例與對照之人口學特徵

變項	病例 N = 71	對照 N = 71	OR (95% C.I.)[a]
性別			
女	28 (39.4%)	28 (39.4%)	1.00
男	43 (60.6%)	43 (60.6%)	1.00 (0.51-1.96)
年齡 (歲，平均 ± 標準差)	63.6 ± 14.0	52.6 ± 11.4**	
≤ 50	10 (14.1%)	32 (45.1%)	1.00
51-59	21 (29.6%)	20 (28.2%)	3.36 (1.32-8.58)*
≥ 60	40 (56.3%)	19 (26.7%)	6.74 (2.75-16.50)**
抽菸狀況			
無	35 (49.3%)	46 (64.8%)	1.00
有	36 (50.7%)	25 (35.2%)	1.89 (0.96-3.71)
抽菸包年			
0	35 (49.3%)	46 (64.8%)	1.00
1-39	17 (23.9%)	19 (26.8%)	1.18 (0.54-2.59)
≥ 40	19 (26.8%)	6 (8.4%)	4.16 (1.50-11.52)**
飲用綠茶 (杯/天)			
≥ 1	13 (18.3%)	18 (25.3%)	1.00
< 1	21 (29.6%)	22 (31.0%)	1.32 (0.52-3.35)
0	37 (52.1%)	31 (43.7%)	1.65 (0.70-3.89)
飲用綠茶年數 (年)			
> 10	21 (29.6%)	20 (28.2%)	1.00
≤ 10	13 (18.3%)	20 (28.2%)	0.62 (0.25-1.57)
0	37 (52.1%)	31 (43.6%)	1.14 (0.52-2.47)
蔬果攝取 (餐/週)			
≥ 21	31 (43.6%)	29 (40.9%)	1.00
15-20	19 (26.8%)	19 (26.7%)	0.94 (0.42-2.12)
≤ 14	21 (29.6%)	23 (32.4%)	0.85 (0.39-1.86)
炒菜油煙 (時/週)			
< 1	66 (93.0%)	64 (90.1%)	1.00
1-3	1 (1.4%)	5 (7.0%)	0.19 (0.02-1.71)
≥ 3	4 (5.6%)	2 (2.8%)	1.94 (0.34-10.96)
肺癌家族史			
無	62 (87.3%)	66 (93.0%)	1.00
有	9 (12.7%)	5 (7.0%)	1.52 (0.89-2.59)
病理型態			
腺癌	52 (73.0%)		
鱗狀細胞癌	14 (19.7%)		
其他 [b]	5 (7.0%)		

[a]以邏輯斯迴歸模式計算。

[b]其他包括小細胞癌 (n = 1) 與未分類 (n = 4)。

*$P < 0.01$，**$P < 0.001$。

表二：miR-29b 表現量在肺癌病例與對照的人口學變項之間的分佈

變項	病例 N	病例 中位數 (最小值-最大值)	對照 N	對照 中位數 (最小值-最大值)	P值[a]
全部	71	62 (0.4-1317.0)	71	95 (0.01-15100.0)	0.104
性別					
女	28	43 (0.4-409.9)	28	87 (5.2-15100.0)	0.091
男	43	65 (0.6-1317.0)	43	102 (0.01-6400.0)	0.437
年齡					
≤ 50	10	46 (0.4-241.0)	32	193 (3.1-6400.0)	0.028
51-59	21	51 (0.9-1032.0)	20	39 (0.01-768.0)	0.382
≥ 60	40	67 (0.6-1317.0)	19	102 (6.1-15100.0)	0.295
抽菸狀況					
無	35	42 (0.4-409.0)	46	128 (6.1-15100.0)	0.003**
有	36	67 (3.7-1317.0)	25	42 (0.01-6400.0)	0.268
抽菸包年					
0	35	42 (0.4-409.0)	46	128 (6.1-15100.0)	0.003**
1-39	17	51 (3.8-558.0)	19	42 (0.01-6400.0)	0.680
≥ 40	19	83 (3.7-1317.0)	6	59 (3.1-182.0)	0.239
飲用綠茶 (杯/天)					
≥ 1	13	65 (3.7-1317.0)	18	97 (0.01-794.0)	0.484
< 1	21	62 (1.0-402.0)	22	78 (3.1-6400.0)	0.489
0	37	51 (0.4-1032.0)	31	114 (11.9-15100.0)	0.209
飲用綠茶年數 (年)					
> 10	21	65 (1.0-1317.0)	20	87 (3.1-6400.0)	0.611
≤ 10	13	45 (9.7-402.0)	20	89 (0.01-794.0)	0.311
0	37	51 (0.4-1032.0)	31	114 (11.9-15100.0)	0.209
蔬果攝取 (餐/週)					
≥ 21	31	65 (0.6-1317.0)	29	172 (3.1-2793.0)	0.274
15-20	19	49 (0.4-478.0)	19	91 (0.01-6400.0)	0.170
≤ 14	21	62 (3.8-1032.0)	23	83 (14.9-15100.0)	0.638
炒菜油煙 (時/週)					
< 1	66	63 (0.4-1317.0)	64	90 (0.01-15100.0)	0.195
1-3	1	35 (35.1-35.1)	5	260 (16.8-794.0)	0.558
≥ 3	4	78 (29.0-218.5)	2	128 (118.7-137.0)	0.817
肺癌家族史					
無	62	65 (0.4-1317.0)	66	103 (0.01-15100.0)	0.153
有	9	43 (0.6-155.6)	5	37 (13.3-571.0)	1.000
病理型態					
腺癌	52	67 (0.4-1317.0)	71	96 (0.01-15100.0)	0.337
鱗狀細胞癌	14	46 (1.0-560.8)	71	96 (0.01-15100.0)	0.085
其他[b]	5	42 (3.99-276.5)	71	96 (0.01-15100.0)	0.173

[a] Wilcoxon rank-sum test 或 Kruskal-Wallis test。

[b] 其他包括小細胞癌 (n = 1) 與未分類 (n = 4)。

表三：DNMT3B mRNA 表現量在肺癌病例與對照的人口學變項之間的分佈

變項	病例 N	病例 中位數 (最小值-最大值)	對照 N	對照 中位數 (最小值-最大值)	*P*值[a]
全部	71	35 (0.4-920.0)	71	30 (0.01-1972.0)	0.625
性別					
女	28	24 (1.9-210.0)	28	29 (1.3-693.0)	0.329
男	43	36 (0.4-920.0)	43	27 (0.01-1972.0)	0.304
年齡					
≤ 50	10	22 (4.8-60.9)	32	34 (3.4-819.0)	0.095
51-59	21	25 (2.6-920.0)	20	27 (1.3-165.0)	0.457
≥ 60	40	37 (0.4-544.0)	19	21 (0.01-1972.0)	0.151
抽菸狀況					
無	35	23 (0.4-210.0)	46	29 (0.01-1972.0)	0.437
有	36	41 (2.6-920.0)	25	27 (12.3-819.0)	0.391
抽菸包年					
0	35	23 (0.4-210.0)	46	29 (0.01-1972.0)	0.437
1-39	17	69 (10.0-920.0)	19	31 (12.9-819.0)	0.066
≥ 40	19	25 (2.6-532.0)	6	20 (12.3-144.0)	1.000
飲用綠茶 (杯/天)					
≥ 1	13	24 (10.1-197.0)	18	24 (0.01-440.0)	0.920
< 1	21	24 (0.4-205.0)	22	33 (3.4-1972.0)	0.112
0	37	51 (1.9-920.0)	31	28 (1.3-693.0)	0.052
飲用綠茶年數 (年)					
> 10	21	20 (0.4-197.0)	20	28 (0.01-1972.0)	0.246
≤ 10	13	24 (1.9-205.0)	20	29 (3.4-440.0)	0.672
0	37	51 (1.9-920.0)	31	28 (1.3-693.0)	0.052
蔬果攝取 (餐/週)					
≥ 21	31	29 (1.9-544.0)	29	28 (0.01-1972.0)	0.882
15-20	19	27 (0.4-137.0)	19	28 (3.4-819.0)	0.579
≤ 14	21	35 (1.9-920.0)	23	31 (1.3-164.0)	0.301
炒菜油煙 (時/週)					
< 1	66	29 (0.4-920.0)	64	30 (0.01-1972.0)	0.961
1-3	1	13 (13.5-13.5)	5	22 (1.3-95.0)	0.558
≥ 3	4	47 (10.0-910.0)	2	23 (10.8-35.0)	0.817
肺癌家族史					
無	62	35 (0.4-920.0)	66	30 (1.3-1972.0)	0.740
有	9	21 (1.9-87.0)	5	10 (0.01-31.0)	0.286
病理型態					
腺癌	52	26 (1.9-920.0)	71	28 (0.01-1972.0)	0.872
鱗狀細胞癌	14	43 (0.4-910.0)	71	28 (0.01-1972.0)	0.225
其他[b]	5	36 (11.1-122.0)	71	28 (0.01-1972.0)	0.722

[a] Wilcoxon rank-sum test或Kruskal-Wallis test。

[b]其他包括小細胞癌 (n = 1) 與未分類 (n = 4)。

表四：miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生之合併效應

變項	病例 (N = 71)	對照 (N = 71)	OR (95% C.I.)	*P*值[a]	OR (95% C.I.)	*P*值[a]
miR-29b/DNMT3B mRNA						
miR-29b 低度表現/DNMT3B 高度表現[b]	22 (31.0%)	11 (15.5%)	4.07 (0.82-20.26)	0.086	3.36 (1.11-10.17)	0.032
miR-29b 高度表現/DNMT3B 高度表現	6 (8.5%)	7 (10.0%)	4.11 (0.60-28.08)	0.149		
miR-29b 低度表現/DNMT3B 低度表現	40 (56.3%)	42 (59.0%)	2.45 (0.57-10.59)	0.231		
miR-29b 高度表現/DNMT3B 低度表現	3 (4.2%)	11 (15.5%)	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
交互作用檢定	χ^2 = 0.707 (1 df); *P* = 0.400					
P for trend = 0.289						

[a] 以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、與抽菸狀況之效應。

[b] 以對照組其 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 之表現依第三分位數來區分為高度與低度表現兩組，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 的表現量是分別以 RNU6B 與 GAPDH 當作內部對照。

表五：抽菸狀況分別與 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用

變項	病例 (N = 71)	對照 (N = 71)	OR (95% C.I.)	*P*值[a]
抽菸狀況/miR-29b				
抽菸者/miR-29b 低度表現	29 (40.8%)	21 (29.6%)	9.17 (1.52-55.34)	0.016
抽菸者/miR-29b 高度表現	7 (9.9%)	4 (5.6%)	12.10 (1.42-102.82)	0.023
無抽菸者/miR-29b 低度表現	33 (46.5%)	32 (45.1%)	3.28 (0.59-18.24)	0.176
無抽菸者/miR-29b 高度表現	2 (2.8%)	14 (19.7%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		χ^2 = 4.94 (1 df); *P* = 0.026		
P for trend = 0.015				
抽菸狀況/DNMT3B mRNA				
抽菸者/DNMT3B mRNA 高度表現	18 (25.4%)	6 (8.5%)	8.09 (2.17-30.11)	0.002
抽菸者/DNMT3B mRNA 低度表現	18 (25.4%)	19 (26.7%)	2.54 (0.88-7.37)	0.086
無抽菸者/DNMT3B mRNA 高度表現	10 (14.0%)	12 (16.9%)	1.06 (0.32-3.52)	0.924
無抽菸者/DNMT3B mRNA 低度表現	25 (35.2%)	34 (47.9%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		χ^2 = 5.673 (1 df); *P* = 0.017		
P for trend = 0.193				

[a] 以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別與年齡之效應。

表六：綠茶飲用分別與 miR-29b、DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用

變項	病例 (N = 71)	對照 (N = 71)	OR (95% C.I.)	*P* 值[a]
綠茶飲用/miR-29b				
未飲茶者/miR-29b 低度表現	32 (45.1%)	23 (32.4%)	2.05 (0.61-6.86)	0.245
未飲茶者/miR-29b 高度表現	5 (7.0%)	8 (11.3%)	1.03 (0.20-5.21)	0.971
飲茶者/miR-29b 低度表現	30 (42.3%)	30 (42.3%)	1.82 (0.57-5.79)	0.312
飲茶者/miR-29b 高度表現	4 (5.6%)	10 (14.0%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		χ^2 = 0.321 (1 df); *P* = 0.571		
P for trend = 0.100				
綠茶飲用/DNMT3B mRNA				
未飲茶者/DNMT3B mRNA 高度表現	19 (26.8%)	4 (5.6%)	3.71 (0.93-14.82)	0.064
未飲茶者/DNMT3B mRNA 低度表現	18 (25.4%)	27 (38.1%)	0.52 (0.21-1.29)	0.157
飲茶者/DNMT3B mRNA 高度表現	9 (12.6%)	14 (19.7%)	0.72 (0.24-2.19)	0.561
飲茶者/DNMT3B mRNA 低度表現	25 (35.2%)	26 (36.6%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		χ^2 = 6.465 (1 df); *P* = 0.011		
P for trend = 0.098				

[a] 以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、與抽菸狀況之效應。