

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計畫名稱：抽菸、綠茶飲用與 DNA 甲基轉移?3B (DNMT3B) 基因多  
\* 形性對於肺癌發生之相關  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 陳依煜  
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-035-B  
研究期間： 100 年 07 月 01 日至 101 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 101 年 03 月 30 日

## 摘要：

抽菸已被建議可引起DNA甲基化 (methylation)，而DNA甲基轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMT]) 3B為DNA甲基轉移酶家族成員；特別的是，強抗氧化劑茶多酚 (tea polyphenols) 也被報告可能能夠抑制DNMT的活性，進而降低腫瘤的發生。因此，我們設計一項病例對照研究來評估抽菸、綠茶飲用和DNMT3B基因多形性對於肺癌 (lung cancer) 發生危險的效應。總計，有204名病例與408名對照被納入本研究分析中，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；DNMT3B基因多形性是以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) 來進行判定。我們的結果顯示，抽菸、綠茶飲用每天少於一杯以及暴露於炒菜油煙每天超過三小時是相關於增加的肺癌危險。進一步地，在調整干擾因子的效應後，相較於攜帶DNMT3B CT基因型之非抽菸者 (odds ratio [OR] = 1.00)，則攜帶DNMT3B CT基因型之抽菸者具有2.60倍 (95% confidence interval [C.I.] = 0.63-10.75) 的肺癌發生危險，而攜帶DNMT3B TT基因型之抽菸者具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 7.10, 95% C.I. = 2.71-18.63)；抽菸狀態與DNMT3B基因型對於肺癌發生危險性，也具有明顯的交互作用存在。同樣的結果，也在抽菸包年與DNMT3B基因型分組中被發現。此外，相較於攜帶DNMT3B CT基因型的飲用綠茶者，攜帶DNMT3B TT基因型的未飲用綠茶者雖具有較高的肺癌發生危險 (OR = 7.55, 95% C.I. = 0.87-65.60)，但此危險性並未達到統計顯著性。我們的結果建議著，啟動子活性較高的DNMT3B TT基因型，可增加因抽菸所引起的肺癌發生危險。

關鍵字：抽菸、DNMT3B基因型、綠茶、肺癌

前言：

肺癌 (lung cancer) 與抽菸和環境二手菸之穩定相關已經被廣泛地建立，並且也預估戒菸可預防超過90%以上的肺癌 [1]。實際上，香煙是一種包含數千種化合物的複雜混合物，其中很多是已知或者是疑似人類致癌物 [2, 3]。香煙的焦油 (tar) 部分已經被顯示是苯醌 (quinone)/對苯二酚 (hydroquinone) 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 [4]。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。

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 (nucleosome positioning) [6]。DNA高度甲基化是表觀遺傳機制對於許多基因默化 (silencing) 的主要關鍵，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 [7, 8]。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 [DNMTs]) 當作催化劑；DNMTs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 [9]。在哺乳動物中，啟動子區域的特徵為GC含量比例約為60-70%；因此，在啟動子上的CpG群島發生DNA甲基化以及影響基因表現的機率也較高 [10]。重要的是，抽菸也已經被建議可引起DNA甲基化，這可能是抽菸所引起的相關癌症之關鍵機

制 [11]。哺乳動物中，DNMT酵素可被區分為DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B與DNMT3L五種 [12]。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為參與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，已經觀察到兩種DNA甲基化酵素DNMT1與DNMT3B的活性具有增加的情形 [13, 14]。而香菸成分中重要的致癌物4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)，也被觀察到可導致DNMT1在肺癌細胞之細胞核中表現與累積 [11]。

茶多酚 (tea polyphenols)，即已知的兒茶素 (catechins)，通常在沖泡的綠茶中佔固體乾重的30-42% [15]；而茶 (發酵過之產物) 中主要的多酚類成分是茶黃素theaflavins (1-3%的乾重) 和茶紅素thearubigins (10-40%的乾重)。與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [16, 17]。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NNK [18]。在另外的實驗中，綠茶多酚則防止了暴露於紫外線UVB輻射之無毛的SKH-1雌性小鼠的脂質過氧化物形成 [19]。並且，綠茶多酚也已經被顯示可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) [20, 21]；然而，目前這些抑制效應的機制還不清楚。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 [12, 22]。

而人類DNMT3B基因是位於染色體20q11.2的位置，在啟動子序列核苷酸-149的位置上包含了一個C至T的轉換，此核苷酸變異能夠增加30%啟動子的活性

[23]；此DNMT3B -149基因多形性也已經被觀察到與癌症的發生具有相關，包括肺癌 [23, 24]、乳癌 [25]、大腸癌 [26] 與胃癌 [27]。然而，我們有興趣更進一步地探討台灣人的DNMT3B基因型與肺癌發生危險之間的相關是否分別在不同抽菸與飲茶習慣者中存在著差異。我們假設在抽菸者中，攜帶DNMT3B -149 T對偶基因型者相較於C對偶基因型者，可能具有較高的啟動子活性，因此就容易因較多的DNA甲基化程度而導致肺癌的發生。但是，茶多酚能夠使DNMT3B甲基化的能力降低，如此的保護作用在飲茶者中則可能使DNMT3B甲基化對於肺癌發生危險的效應較不明顯。相反地，不飲茶者缺乏茶多酚對於DNMT3B甲基化的抑制作用；因此，攜帶DNMT3B T對偶基因型之不飲茶者所具有的肺癌發生危險效應將會是較明顯的。此外，抽菸與DNMT3B基因型、以及綠茶飲用與DNMT3B基因型對於肺癌發生之危險將是具有交互作用存在。

## 材料和方法：

### 研究對象

本計畫是審核通過後始執行的。總計，共有204位原發性肺癌（國際疾病分類第9版；ICD9代碼162）病患從彰化基督教醫院與台中澄清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 [WHO]）的分類方式來決定 [28]。同時，408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健康檢查。

### 流行病學資料

所有參與者的同意書皆被獲取。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；而烹飪的暴露，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。在台灣用來飲用綠茶的茶杯體積較小（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、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，每天所飲用的杯數也被進一步地確認。我們針對問題的答覆，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、每天十杯以上 [29]。

## DNMT3B基因多形性

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，並且被分離成為血漿、buffy coat和紅血球。這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C下；基因型的測定是從buffy coat萃取出DNA來進行。

根據Shen等人 [23] 的研究，DNMT3B基因多形性是在執行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR]) 增幅後，以限制片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 分析來辨識在DNMT3B基因之BfaI於啟動子限制酶辨識點的差異。一段包含此基因多形性的380 bp之基因體DNA片段被增幅，用以增幅DNMT3B基因的引發子 (primers) 序列為5'-TGC TGT GAC AGG CAG AGC AG-3'和5'-GGT AGC CGG GAA CTC CAC GG-3'。0.5 µl的DNA被加至包含200 ng的引發子、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM的dNTPs、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH = 8.3) 和0.1%的BSA的PCR緩衝劑中，最後總體積被調整為50 µl。PCR循環參數組成為95°C下五分鐘之先前培養，接續於95°C下30秒之變性步驟、63°C下90秒之重鍊、以及72°C下40秒之延展，共35回合循環，反應於最後的72°C十分鐘之延展後終止。PCR產物也在37°C下以5U的BfaI酵素消化16小時，消化產物於3%之瓊膠中以ethidium bromide染色後判讀。攜帶同型的DNMT3B CC基因型個體顯現出208、126和46 bp三段產物片段，同型的DNMT3B TT基因型個體表現出162、126和46 bp三段產物片段；而異型的DNMT3B CT基因型者則有208、162、126和46 bp四段產物片段。

## 統計分析

對於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、蔬菜與水果的攝取量、過往烹煮的暴露、與肺癌家族史之比較，若是連續性變項是以Student's *t*-test檢定；若是類別性變項則以 $\chi^2$ -test或Fisher's exact test檢定。 $\chi^2$ -test也被執行以檢定在病例組與對照組中DNMT3B基因型的盛行率差異。隨後，使用邏輯斯迴歸分析模式 (logistic regression model) 求取每個變項的調整後危險對比值 (adjusted odds ratio [OR]) 以及95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.])。另外，分層分析 (stratification) 被執行以檢定抽菸狀況、綠茶飲用量以及DNMT3B基因多形性之間是否對於肺癌發生危險性具有交互作用；所有的*P*值皆以雙尾檢定來計算。

## 結果：

總計，共有612名研究對象 (381名男性與231名女性) 參與本研究，年齡範圍從38歲至93歲，其特徵整理於表一。在具有組織學確認為原發性肺癌之204名病例中，117名 (57.4%) 為肺腺癌以及51名 (25.0%) 為鱗狀細胞癌。研究對象中男性所佔的比例為62.3%，女性為37.7%；肺癌病患的平均年齡為66.6歲，對照為65.2歲。如同我們所預期的，相較於對照，肺癌病例中具有較多抽菸者 (55.4% vs. 31.1%；OR = 2.75；95% C.I. = 1.94-3.89)；35.8%的病例抽菸超過40包年，而在對照中此數值是16.0% (OR = 3.42；95% C.I. = 2.27-5.14)。在飲用綠茶的部分，肺癌病例相較於對照有較高比率之未飲用綠茶者 (79.9% vs. 64.9%)；在飲用綠茶的時間上，病例組也僅有9.3%超過十年，相較於對照組17.4%是具有顯著的差異。然而，蔬果攝取在病例與對照組間並沒有顯著的差異。此外，相較於對照，炒菜油煙暴露以及肺癌家族史在病例組有較高的比例，並且此差異達到統計上的顯著性。研究對象之DNMT3B基因型的盛行率，顯示在表二。在病例組中，DNMT3B



的 C 與 T 對偶基因的頻率分別是2.9%以及97.1%，而對照組的 C 與 T 對偶基因的頻率分別是4.9%以及95.1%；基因型頻率分佈在病例組與對照組間並沒有顯著的差異 (OR = 1.70；95% C.I. = 0.88-3.27)。

隨後，我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險之相關 (表三)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT3B CT 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3B TT 基因型之非抽菸者具有1.03倍 (95% C.I. = 0.42-2.55) 的肺癌發生危險，攜帶 DNMT3B CT 基因型之抽菸者具有2.60倍 (95% C.I. = 0.63-10.75) 的肺癌發生危險；然而，攜帶 DNMT3B TT 基因型之抽菸者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 7.10，95% C.I. = 2.71-18.63)。並且，抽菸狀況與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性具有邊緣顯著的交互作用存在 ( $P = 0.08$ )。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 DNMT3B CT 基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3B TT 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 5.25, 95% C.I. = 1.88-14.67)、以及攜帶 DNMT3B TT 基因型且抽菸包年為大於40包年者 (OR = 8.60, 95% C.I. = 3.19-23.17) 分別具有顯著較高的肺癌發生危險性；並且，累積抽菸量與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性也具有顯著的交互作用存在 ( $P = 0.03$ )。

接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估DNMT3B基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表四)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶DNMT3B CT基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 DNMT3B TT基因型之飲用綠茶者並不具有顯著較高的肺癌發生危險性；而攜帶 DNMT3B CT與TT基因型之未飲用綠茶者則具有5.06倍 (95% C.I. = 0.52-49.34)

與7.55倍 (95% C.I. = 0.87-65.60) 的肺癌發生危險性，但同樣地並未達到統計上的顯著性。

#### 討論：

現今的研究觀察到，抽菸與 DNMT3B 基因型對於肺癌的發生危險性具有顯著的交互作用存在；然而，我們並無法觀察到綠茶飲用與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性的交互作用。

DNMT3B 為 DNMT 家族中的一員，其功能可使基因重新甲基化；而且在 DNMT3B 啟動子序列核苷酸-149 的位置上包含了一個 C 至 T 的轉換，此核苷酸變異能夠增加 30% 啟動子的活性 [23]，並且此核苷酸變異也已經被觀察到與若干癌症的發生具有相關 [23-27]。在本研究中，攜帶 DNMT3B TT 基因型者相較於攜帶 CT 基因型者具有較高的肺癌發生危險，雖然如此的結果並未達到統計上的顯著性。原先一項於美國所執行的研究也觀察到，攜帶 DNMT3B -149 T 對偶基因者是相對於肺癌發生之增加危險 [23]。雖然，目前並不完全明瞭 DNMT3B -149 C→T 的置換對於 DNMT3B 表現的整體影響；然而，證據顯示在 DNMT3B 啟動子上的變異是可以增加啟動子活性，並且可能向上調控參與在一些抑癌基因 (tumor suppressor gene) 之 CpG 群島重新甲基化作用的基因之表現 [30, 31]。另一方面，Garzon 等人 [32] 則在大腸癌細胞株中觀察到，若阻斷 DNMT3B 的基因表現，可減少 3% 全基因體 DNA 甲基化 (global DNA methylation)；然而，如果同時阻斷 DNMT3B 及 DNMT1 的基因表現，將可廢除 DNMT 的活性，並且可以減少 95% 的全基因體 DNA 甲基化。因此，我們現今結果並無法直接觀察到 DNMT3B 對於肺癌發生危險之獨立效應，建議著可能需要同時於肺癌發生危險

性中評估 DNMT1 與 DNMT3B 的重要性。

香菸成分中的重要致癌物 NNK 已經被建議可以引起 DNA 甲基化，因而導致若干癌症的發生，包括肺癌 [11]。NNK 可以透過 AKT 路徑而減弱  $\beta$ TrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3 $\beta$ / $\beta$ TrCP 蛋白降解體路徑去活化；並且也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，並將  $\beta$ TrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，而在細胞核中大量累積，進而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 [11]。有趣的是，我們現今的研究在吸菸者中觀察到攜帶 DNMT3B TT 基因型者相較於攜帶 DNMT3B CT 基因型者具有較高的肺癌發生危險性；並且，抽菸狀態與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性也具有明顯的交互作用存在。然而，如此的觀察在未來仍需要進一步的功能性研究來加以確認，例如驗證 NNK 可否透過 AKT 路徑來使 DNMT3B 蛋白累積。

許多實驗研究報告顯示，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 [18]；而與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [16, 17]。茶多酚明顯地是種強抗氧化物，並且可以有效地清除自由基，它們也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 [18, 33]。茶多酚也已經被顯示，可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 [20, 21]。這些證據支持著我們的結果，未飲用綠茶者相較於飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險。特別的是，我們先前的研究也發現 [34]，綠茶飲用與抽菸對於肺癌之發生危險是具有交互作用存在的；未飲用綠茶者較飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險性，而在吸菸者中此效應更為明顯。

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 SAM 做為甲基的提供者，再以 DNMTs 當作催化劑 [9]。此外，先前的研究指出茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 [EGCG] 在不同組織或癌症細胞中能夠抑制 DNMT 的活性，進而可能降低腫瘤的發生 [12, 22]。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藉由兒茶酚-O-甲基轉移酶 (catechol-O-methyltransferase [COMT]) 來減少 SAM，導致 DNMT 作用被抑制。然而，在我們的研究中並未觀察到綠茶與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性的交互作用，原因可能是因為我們研究對象的樣本數不足，限制了相關的統計檢定力。此外，我們並無法實際評估茶多酚於人體中之生物利用度，也未能評估 COMT 基因的角色。未來的研究應該致力於瞭解 COMT 基因對於綠茶所抑制肺癌相關之 DNA 甲基化的影響，並且評估綠茶飲用對於其他 DNMT 甲基化表現與肺癌發生關係之影響。

許多人類的觀察研究建議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危險呈現反向關係；但是在一項西班牙的病例對照研究中，並沒有發現蔬果攝取對於肺癌具有保護效應 [36]。我們的結果也顯示，蔬果攝取與肺癌危險並沒有相關存在。可能的原因是利用問卷去估計蔬果攝取量是無法準確評估實際的攝取量，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食頻率是有困難的。蔬果攝取量與肺癌危險之間的關係，仍有待進一步的研究來加以釐清。烹飪油煙的複雜成分中，芳香雜環化合物 (aromatic heterocyclic amines [HCAs]) 是主要的致癌物，並且與肺癌相關 [37]。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有一個趨勢關係存

在；特別在炒菜油煙每週暴露大於三小時以上者具有較高的肺癌發生危險。另外，我們也去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。

我們的研究中，健康對照的 DNMT3B T 對偶基因頻率為 95.1%，是接近於過去華人研究所報告的頻率 (97.8%) [38]；而且我們研究對象之 DNMT3B 基因多形性的頻率也符合哈溫定律，證實著我們基因型技術的可信性和成果。在本研究中，我們的研究對象樣本數較少，因此經過分層分析後，會限制基因型與肺癌發生危險相關判定的檢定力；並且使用問卷詢問綠茶飲用量以及茶品種類的錯誤分類，可能無法準確評估綠茶實際攝取的劑量。因此，未來仍需增加研究對象的樣本數以及設計更有效的研究方法，以更確立我們的結果。

我們的結果建議著，在抽菸者中，DNMT3B TT 基因型可能增加啟動子的活性，進而造成 DNA 高度甲基化，而導致肺癌的發生。

#### 致謝：

本研究感謝國科會 (NSC100-2815-C-040-035-B) 的贊助，也感謝翁瑞宏老師、李鴻森老師、何明霖醫師、陳俊傑醫師、賴重佑醫師、黃駿煌學長、黃家禎學姊、蔡燕微同學、林潔麗同學的協助。

#### 參考文獻：

1. Boyle P. Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. Lung Cancer. 12(3):167-81, 1995.
2. Hoffmann D. Djordjevic MV. Hoffmann I. The changing cigarette. Prev Med.

- 26(4):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(4595):425-7, 1983.
  6. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 358(11):1148-59, 2008.
  7. Jones PA. Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3(6):415-28, 2002.
  8. Jones PA. Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 293(5532):1068-70, 2001.
  9. Taby R. Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin.* 60(6):376-92, 2010.
  10. Saxonov S. Berg P. Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(5):1412-7, 2006.
  11. Lin RK. Hsieh YS. Lin P. 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(2):521-32, 2010.
  12. Tang M. Xu W. Wang Q. et al. Potential of DNMT and its epigenetic regulation for lung cancer therapy. *Curr Genomics.* 10(5):336-52, 2009.
  13. Clark SJ. Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene.* 21(35):5380-7, 2002.
  14. 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(4):527-32, 2003.
15. Balentine DA. Wiseman SA. Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 37(8):693-704, 1997.
  16. Wiseman SA. Balentine DA. Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 37(8):705-18, 1997.
  17. 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(4):262-6, 1999.
  18. Yang CS. Wang ZY. Tea and cancer. *Natl Cancer Inst*. 85(13):1038-49, 1993.
  19. 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(5):927-36, 2003.
  20. Yang GY. Liao J. Li C. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis*. 21(11):2035-9, 2000.
  21. 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(4):611-6, 1998.
  22. 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(22):7563-70, 2003.
  23. Shen H. Wang L. Spitz MR. et al. A novel polymorphism in human cytosine

- DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res.* 62(17):4992-5, 2002.
24. Lee SJ. Jeon HS. Jang JS. et al. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis.* 26(2):403-9, 2005.
  25. Montgomery KG. Liu MC. Eccles DM. et al. The DNMT3B C→T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 6(4):R390-4, 2004.
  26. Fan H. Zhang F. Hu J. et al. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of colorectal cancer in Chinese: a case-control study. *Exp Clin Cancer Res.* 27:24, 2008.
  27. Hu J. Fan H. Liu D. et al. DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 55(4):1011-6, 2010.
  28. Anonymous. *Histological typing of lung tumors (2nd ed.)*. World Health Organization, Geneva, 1981.
  29. Tsubono Y. Nishino Y. Komatsu S. et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med.* 344(9):632-6, 2001.
  30. Okano M. Bell DW. Haber DA. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99(3):247-57, 1999.
  31. Robertson KD. Uzvolgyi E. Liang G. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27(11):2291-8, 1999.
  32. Garzon R. Liu S. Fabbri M. et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood.*



- 113(25):6411-8, 2009.
33. Ahmad N. Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev.* 57(3):78-83, 1999.
  34. Lin IH. Ho ML. Chen HY. et al. Smoking, green tea consumption, genetic polymorphisms in the insulin-like growth factors and lung cancer risk. *PLoS One.* 7(2):e30951, 2012.
  35. Lee WJ. Shim JY. Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol.* 68(4):1018-30, 2005.
  36. Ruano-Ravina A. Figueiras A. Dosil-Diaz O. et al. A population-based case-control study on fruit and vegetable intake and lung cancer: a paradox effect? *Nutr Cancer.* 43(1):47-51, 2002.
  37. Seow A. Poh WT. Teh M. et al. Fumes from meat cooking and lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(11):1215-21, 2000.
  38. Chen Z. Zhou Z. Chen X. et al. Single Nucleotide polymorphism in DNMT3B promoter and the risk for idiopathic thrombocytopenic purpura in Chinese population. *J Clin Immunol.* 28(5):399-404, 2008.

表一：肺癌病例與對照之人口學特徵的頻率分佈

變項	病例 N = 204	對照 N = 408	OR (95% C.I.) <sup>a</sup>
性別			
女	77 (37.7%)	154 (37.7%)	1.00
男	127 (62.3%)	254 (62.3%)	1.00 (0.71-1.41)
年齡 (歲, 平均 ± 標準差)	66.6 ± 11.3	65.2 ± 11.3	
≤ 50	18 (8.8%)	39 (9.5%)	1.00
51-59	37 (18.1%)	88 (21.6%)	0.91 (0.46-1.79)
≥ 60	149 (73.1%)	281 (68.9%)	1.15 (0.64-2.08)
抽菸狀況			
無	91 (44.6%)	281 (68.9%)	1.00
有	113 (55.4%)	127 (31.1%)	2.75 (1.94-3.89) <sup>***</sup>
抽菸包年			
0	91 (44.6%)	281 (68.9%)	1.00
1-39	40 (19.6%)	61 (14.9%)	2.03 (1.27-3.22) <sup>**</sup>
≥ 40	73 (35.8%)	66 (16.2%)	3.42 (2.27-5.14) <sup>***</sup>
飲用綠茶 (杯/天)			
≥ 1	13 (6.4%)	84 (20.6%)	1.00
< 1	28 (13.7%)	59 (14.5%)	3.07 (1.47-6.41) <sup>**</sup>
0	163 (79.9%)	265 (64.9%)	3.97 (2.15-7.36) <sup>***</sup>
飲用綠茶年數 (年)			
> 10	19 (9.3%)	71 (17.4%)	1.00
≤ 10	22 (10.8%)	72 (17.7%)	1.14 (0.57-2.29)
0	163 (79.9%)	265 (64.9%)	2.30 (1.34-3.95) <sup>**</sup>
蔬果攝取 (餐/週)			
≥ 21	100 (49.0%)	202 (49.5%)	1.00
15-20	52 (25.5%)	72 (17.7%)	0.78 (0.53-1.17)
≤ 14	52 (25.5%)	134 (32.8%)	1.46 (0.95-2.24)
炒菜油煙 (時/週)			
< 1	167 (81.9%)	378 (92.7%)	1.00
1-3	18 (8.8%)	17 (4.1%)	3.31 (1.60-6.86) <sup>**</sup>
≥ 3	19 (9.3%)	13 (3.2%)	2.40 (1.21-4.77) <sup>*</sup>
肺癌家族史			
無	192 (94.1%)	401 (98.3%)	1.00
有	12 (5.9%)	7 (1.7%)	1.73 (1.16-2.57) <sup>**</sup>
病理型態			
腺癌	117 (57.4%)		
鱗狀細胞癌	51 (25.0%)		
其他 <sup>b</sup>	36 (17.6%)		

<sup>a</sup>以邏輯斯迴歸分析模式計算。

<sup>b</sup>其他包括小細胞癌 (n = 8)、大細胞癌 (n = 1)、混和細胞癌 (n = 6) 與未分類 (n = 21)。

\* 0.01 < P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001。

表二：肺癌病例與對照之 DNMT3B 基因型的頻率分佈

變項	病例 N = 204	對照 N = 408	OR (95% C.I.) <sup>a</sup>
DNMT3B			
CC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
CT	12 (5.9%)	40 (9.8%)	1.00
TT	192 (94.1%)	368 (90.2%)	1.74 (0.89-3.39)
C對偶基因	12 (2.9%)	40 (4.9%)	1.00
T對偶基因	396 (97.1%)	776 (95.1%)	1.70 (0.88-3.27)

<sup>a</sup>以邏輯斯迴歸分析模式計算。

表三：在抽菸狀況及抽菸包年分組中，不同 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險之相關

變項	DNMT3B CT 基因型			DNMT3B TT 基因型		
	病例	對照	OR (95% C.I.) <sup>a</sup>	病例	對照	OR (95% C.I.) <sup>a</sup>
抽菸狀況						
非抽菸者	7	25	1.00	84	256	1.03 (0.42-2.55)
抽菸者	5	15	2.60 (0.63-10.75)	108	112	7.10 (2.71-18.63)*
交互作用檢定	$\chi^2 = 3.13$ (1 df); $P = 0.08$					
抽菸包年						
0	7	25	1.00	84	256	1.03 (0.41-2.54)
1-39	2	7	2.10 (0.33-13.42)	38	54	5.25 (1.88-14.67)*
$\geq 40$	3	8	3.06 (0.54-17.27)	70	58	8.60 (3.19-23.17)*
交互作用檢定	$\chi^2 = 6.76$ (2 df); $P = 0.03$					

<sup>a</sup>以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露和肺癌家族史的效應。

\* $P < 0.001$ 。

表四：在綠茶飲用狀況及飲用綠茶量分組中，不同 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險之相關

變項	DNMT3B CT 基因型			DNMT3B TT 基因型		
	病例	對照	OR (95% C.I.) <sup>a</sup>	病例	對照	OR (95% C.I.) <sup>a</sup>
飲用綠茶狀況						
飲茶者	2	11	1.00	39	132	1.56 (0.17-14.62)
未飲茶者	10	29	5.06 (0.52-49.34)	153	236	7.55 (0.87-65.60)
交互作用檢定	$\chi^2 = 1.14$ (1 df); $P = 0.29$					
綠茶飲用年數						
> 10	2	6	1.00	17	65	1.04 (0.18-6.09)
≤ 10	10	34	1.70 (0.27-10.78)	175	303	2.72 (0.50-14.82)
交互作用檢定	$\chi^2 = 1.36$ (1 df); $P = 0.24$					

<sup>a</sup>以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露和肺癌家

族史的效應。