

## 壹、中文摘要：

肺癌是台灣地區女性癌症的第一大死亡原因。然而，台灣婦女抽菸的比例不到百分之十，因此抽菸習慣無法完全解釋台灣婦女為何罹患肺癌。此外，在台灣女性肺癌中也發現 p53 基因與 K-ras 基因突變的機率很低。所以，我們假設：在肺腫瘤形成之過程中，p16<sup>INK4a</sup> 基因的不活化在性別上扮演著不一樣的角色。本篇研究中，選取 143 位非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者，包括 62 位抽菸者與 81 位不抽菸者，以免疫組織化學染色法 (IHC) methylation-specific PCR (MS-PCR) 基因座異質性缺失 (LOH) 與反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR)，偵測 p16<sup>INK4a</sup> 基因在蛋白、染色體、促進子區域及 mRNA 等各層次不活化的分析探討。由先前的研究得知，抽菸的肺癌患者中，在 p16<sup>INK4a</sup> 區域發生 LOH 的頻率顯著高於不抽菸患者 (70% for smoker vs. 28 % for nonsmoker, P=0.02)。而亦發現 p16<sup>INK4a</sup> 區域 LOH 的發生與抽菸習慣、腫瘤形式、性別等臨床因子有顯著的相關性 (P = 0.004 for smoking status, P = 0.004 for tumor type and P = 0.001 for gender)。當以性別與抽菸習慣區分肺癌患者為抽菸男性、不抽菸男性及不抽菸女性等三組時，發現不抽菸女性肺癌患者之 p16<sup>INK4a</sup> promoter hypermethylation 頻率顯著高於不抽菸男性 (P = 0.029)，在抽菸男性與不抽菸男性患者則無此差異 (P = 0.330)。此外，有 52 %

的不抽菸女性與 23 % 不抽菸男性患者可用 p16<sup>INK4a</sup> 促進子高度甲基化來解釋 p16<sup>INK4a</sup> 基因的不活化。不抽菸女性 LOH 發生頻率較不抽菸男性低，但無統計上的差異，與男性患者僅有邊緣上的差異性 (10 % for nonsmoking female vs. 33 % for nonsmoking male , P = 0.097)。總而言之，不抽菸女性肺癌患者是透過 p16<sup>INK4a</sup> 促進子高度甲基化的機制造成 p16<sup>INK4a</sup> 基因的不活化，而非基因座異質性缺失。然而不抽菸男性肺癌患者則是與抽菸男性肺癌患者相同，皆透過基因座異質性缺失而造成 p16<sup>INK4a</sup> 基因的不活化。因此，台灣肺癌患者在 p16<sup>INK4a</sup> 基因不活化的機制上具有性別上的差異。由過去的研究結果已知，p16 基因的甲基化與暴露特殊的致癌物和病毒感染有關。因此推測，台灣女性肺癌患者有高頻率 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 造成 p16 的去活化，可能與特殊的環境暴露或病毒感染有關。由以上結果顯示，p16<sup>INK4a</sup> 促進子高度甲基化在台灣女性肺腫瘤化過程中，扮演著重要的角色。

## 貳、前言

根據衛生署民國八十九年統計資料指出，惡性腫瘤為國人十大主要死因之冠，其中又以肺癌為首。尤其是女性肺癌，自民國七十五年起即超越子宮頸癌，躍居女性惡性腫瘤死因的首位至今。由過去的統計資料顯示，在 1955 年男性與女性的肺癌死亡率每十萬人分別為 2.67 人和 1.25 人，但根據衛生署 2000 年最新資料指出，男性與女性的肺癌死亡率驟升至每十萬人分別為 38.69 人和 17.25 人，在這四十餘年間，暴增了 14 至 15 倍( Department of Health , 2000 )。

在國外，自 1980 年代開始，美國男性的肺癌死亡率已逐漸趨緩，但仍高居美國男性癌症死亡首位。美國女性的肺癌死亡率卻逐年上升，早在 1987 年時，即超越乳癌成為美國女性癌症死因的第一位 (Greenlee et al., 2001)。所以不論在台灣或是美國，肺癌的防治都是重要的研究課題。

已知抽菸是引起肺癌的主要致癌因子，台灣肺癌男、女性病患抽菸的比例各為 80 % 與 7 % ，和歐美肺癌男、女性病患抽菸的比例 98 % 與 70 - 90 % (Koo et al., 1990)，因此抽菸無法說明台灣女性為何有較高的肺癌死亡率(男、女性肺癌死亡率為 2 : 1)。流行病學研究指出，台灣女性肺癌的發生與其烹調油煙之暴露有關(Ko et al., 2000)，而其他可能致病因子還包括二手菸和肺部相關疾病等(Chen et

al., 1990 ; Lee et al., 2000)。

根據世界衛生組織對肺癌的分類，將原發性肺癌主要分為小細胞肺癌(small cell lung carcinomas ; SCLC)與非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinomas ; NSCLC)兩大類型。小細胞肺癌多發於男性，與抽菸有著密切的關係，佔全部肺癌的 20% 。臨床上，因小細胞肺癌生長快速，在罹患小細胞肺癌初期時，即具有廣泛的擴散性，而不易以外科切除的方式治療，多以化學藥物合併放射線治療為主。非小細胞癌依據腫瘤細胞的型態可再分為鱗狀上皮細胞癌(squamous cell carcinomas)、腺癌(adenocarcinomas)與大細胞癌(large cell carcinomas)等三種。在台灣，男性肺癌以鱗狀上皮細胞癌為主；女性肺癌則以腺癌為主( Lee et al., 2001)。非小細胞癌約佔肺癌的 80 %，生長較緩慢，在臨床上大多以手術切除的方式治療。肺癌患者的預後狀況相當的差，5 年的存活率低於 15 % (Zochbauer-Muller, et al., 2002)。

以現有的診斷方式，要在早期發現肺癌仍然相當困難，但肺癌的早期發現對於肺癌之預後具有關鍵性的影響。因此，以分子生物的技術建立早期肺癌的診斷指標，是相當迫切需要的。

## 參、文獻綜論

### 一、p16 抑癌蛋白的結構與功能及在肺癌的相關研究

#### 1. p16<sup>INK4a</sup> 蛋白和細胞週期

##### 1.1 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的功能與介紹

在 1993 至 1994 年間，科學家用 yeast two-hybridization 的方法，發現了數個能與 cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) 結合的蛋白；而 p16 是其中之一 (Serrano et al., 1993)。人類的 p16 基因具有 3 個 exon；分別是：exon1 (125bp)、exon2 (307bp)、exon3 (12bp)，可轉譯出一具有 156 個胺基酸的蛋白其分子量大小為 16569 daltons (Ruas et al., 1998)。此蛋白有著四個 ankyrin 的重覆片段，使 p16 蛋白具有與其他蛋白交互作用的能力。Ankyrin 的重覆片段形成內凹的 L 型結構，藉著此構造，p16 蛋白能與 CDK4/6 相互結合，形成 heterodimer。(Russo et al., 1998；Brotherton et al., 1998)。

p16 蛋白有許多相關的名稱，如：MTS-1 (Major Tumor Suppressor -1)、INK4a (Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a) 和 CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) 等。而 p16 蛋白是個 G<sub>1</sub> phase 特定的細胞週期 (cell cycle) 的調控因子 (Liggett et al., 1998；Rocco et al., 2001)。

## 1.2 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白與 cyclin D<sub>1</sub>、CDK4/6、pRB 之關係

p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的抑癌能力是藉由與 CDK4/6 結合後,而影響 CDK4/6 與 cyclin D<sub>1</sub> 的結合複合體(complex),使複合體喪失對 pRb (retinoblastoma)磷酸化的催化作用,進而讓 pRb 得以與 E<sub>2</sub>F(transcription factor)結合,達到抑制細胞週期的進行(Roussel et al., 1999; Sherr et al., 1996; Huschtscha et al., 1999; Schutte et al., 1997)。當 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的量增加時,會形成 CDK4-6/p16<sup>INK4a</sup> 的二元複合體並降低 CDK4/6-cyclin D<sub>1</sub> 二元複合體的生成,進一步導致游離態 cyclin D<sub>1</sub> 經由 ubiquitin-dependent proteasome pathway 的途徑,被降解掉(Diehl et al., 1997),如 Fig 6 所示。

藉由抑制 pRb 的磷酸化, p16<sup>INK4a</sup> 蛋白可抑制細胞的轉錄作用,使得細胞週期的前進停滯在 G<sub>1</sub>/S 期之間(Sherr et al., 1999; Zhang et al., 1999)。

## 2. p16<sup>INK4a</sup> 蛋白與癌症之關係

p16<sup>INK4a</sup> 基因的不活化(inactivation)在肺癌中是常見的致腫瘤機制之一，其不活化的機制主要為：促進子甲基化 ( promoter methylation )、基因座缺失(LOH, Loss of Heterozygosity)，而基因突變則較少出現。由先前的研究指出；p16<sup>INK4a</sup> 基因去活化可由 p16<sup>INK4a</sup> 免疫組織化學染色法得知，腫瘤組織中 p16 蛋白的表現與否。再以促進子甲基化、基因座缺失、及基因突變，以了解 p16 蛋白之不表現與何種不活化機制較有關(Kashiwabara et al., 1998 ; Gazzeri et al., 1998 ; Zochbauer-Muller et al., 2002)。

### 2.1 以 Immunohistochemistry( IHC )探討 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現

在 NSCLC(Non Small Cell Lung Cancer)中，患者有正常的 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現時，其預後較佳。且依腫瘤型態的不同，鱗狀上皮細胞癌的不表現率比腺癌細胞來的高。鱗狀上皮細胞癌早期 stage1-2 的病患如有 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現，其預後較好(Taga et al., 1997)。

在不同的癌症腫瘤細胞中，p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的不表現率亦都不同。中樞神經系統淋巴瘤細胞(CNS lymphoma)，p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的不表現率約 50~60 %；頭頸鱗狀上皮細胞癌則為 83 %；胃癌則為 22%。在

NSCLC 中，大約有 27~ 63%左右的不表現率。(Nakamura et al., 2001 ; Reed et al., 1996 ; Sanchez-Cespedes et al., 2001b ; Gazzeri et al., 1998 ; Song et al., 2000)。

## 2.2 以 Methylation-specific PCR (MSP) 探討 p16<sup>INK4a</sup> 基因促進子 高度甲基化( promoter hypermethylation )的情形

由先前的研究已知，促進子 CpG island 的甲基化是抑制轉錄作用的重要機制之一(Robertson et al., 2001)。在正常的細胞中，CpG island 只會在適當的位置甲基化。關鍵性基因的甲基化，在癌化的過程中扮演重要的角色。例如腎癌細胞中發現 VHL 基因在 CpG island 上具有甲基化(Herman et al., 1994)；且 Rb 基因也因甲基化存在而致使其無法發揮正常功能(Sakai et al., 1991)；而抑癌基因 p16<sup>INK4a</sup> 在非小細胞肺癌中也常發生 hypermethylation 的現象。p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 的比例在各癌症中也不大相同：肝癌 15 %、大腸癌 37 %、乳癌 17 %、頭頸癌 27%，在肺癌中則約為 31 % ( Esteller et al., 2001)。

在 NSCLC 中，p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 的比例，依腫瘤細胞的形式區分，以鱗狀上皮細胞癌者居多(41%)；多於腺癌細胞(22%)。分析預後與 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 的關係可知，沒有 hypermethylation 者其預後較有 hypermethylation 者為佳。而抽菸者 hypermethylation



的比例較不抽菸者高(Gorgoulis et al., 1998 ; Kim et al., 2001)。此外 , p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 更可做為早期肺癌治療的生物指標 (biomarker)(Belinsky et al., 1998)。在人類頭頸癌方面 , p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 更伴隨著 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白高度的不表現(Reed et al., 1996)。在細胞實驗中 , 加入去甲基化藥物 : 5-aza-2' - deoxy-cytosine , 於已甲基化的細胞內 , 可顯著降低 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 的程度 , 並使得 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白重新表現 , 並造成細胞週期停滯於 G<sub>1</sub>/S 期 (Zhu et al., 2001)。許多研究確切地指出 : p16<sup>INK4a</sup> hyper- methylation 在許多不同的癌症種類中扮演著致癌化的重要機制 (Rocco et al., 2001)。

### 2.3 以 Loss of Heterozygosity(LOH)探討染色體 9p21 基因座異質性缺失

LOH 的發生在非小細胞肺癌中是很常見的現象 , 尤其是在染色體 3p、9p、17p 等抑癌基因所在的位置 (Testa et al., 1997) , 而 p16<sup>INK4a</sup> 基因則位於染色體 9p21 的位置上。在其他的癌症 , 如 : 皮膚癌、食道癌、胰臟癌、乳癌、膀胱癌等癌症中 , p16<sup>INK4a</sup> 基因發生 LOH 的機率很高 (Gorgoulis et al., 1998 ; Rocco et al., 2001) 1994 年 , Sidransky 等人在第九號染色體上 , 發現 9p21~22 的位置時常發生 LOH 的現象 ; 而此即日後所知 p16<sup>INK4a</sup> 基因的所在 (Merlo et al., 1994)。由於染色體

9p21 在肺癌中時常發生缺失，所以科學家也試著用 LOH 的方式在此位置上 CDKN2a 處附近找尋，是否有其他抑癌基因的存在 (Mead et al., 1997)。

在 NSCLC 的肺腺癌患者中，抽菸者各個染色體(chromosome 1 22) LOH 的比例較不抽菸者高；而染色體 9p21 的位置也是如此。在最近的研究更將 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與染色體 9p21 發生 LOH 的比例做一比較；得知：染色體 9p21 發生 LOH 的頻率在抽菸者比不抽菸者高，而不抽菸者則以 hypermethylation 的比例高於抽菸者 (Shapiro et al., 1995a ; Sanchez-Cespedes et al., 2001a ; Kim et al., 2001)。由此推測：抽菸與不抽菸者致癌的機制並不相同；在抽菸者方面，香菸中的致癌物質會直接造成基因的改變而導致癌症的發生。不抽菸者則是甲基化；為 epigenetic 的因素使其罹患癌症。

#### 2.4 以 RT-PCR 探討 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表現

由於 p16<sup>INK4a</sup> 基因在 DNA 層面易受到去活化的影響，所以從 RNA 的層面探討是否因 p16<sup>INK4a</sup> 基因的缺失使得 mRNA 的表現真正受到影響。在乳癌研究中發現，p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表現與 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 呈負相關；甲基化的程度越高時，p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表現量也相對地降低。但過度表現的 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 可做為預後較差的指

標(Hui et al., 2000)。在原位神經瘤中，也有相同的發現(Omura-Minamisawa et al., 2001)，但在肺癌中則無此發現。

## 二、促進子高度甲基化 ( promoter hypermethylation )

哺乳動物細胞藉由鹼基胞嘧啶(cytosine)甲基化的結果；形成 5'-methylcytosine 來修飾基因體(genome)的表現(Bird et al., 1992 ; Baylin et al., 1998)；例如：X-chromosome inactivation (Panning et al., 1998)、DNA 標記(imprinting)(Li et al., 1993)等。在哺乳動物基因體中大約有 70 % 的 CpG island 具有甲基化的情形(Cooper et al., 1989 ; Feinberg et al., 2001 ; Jones et al., 2001)；在正常的細胞中，cytosine 的甲基化可調控特定基因的表現與否，以使各基因維持細胞穩定的狀態(Esteller et al., 2002)。如果細胞內 DNA 甲基化的程度與位置失去調控，則可能造成基因的不表達與不適當的表現，進而使得染色質的結構改變，以致基因體的不穩定，最後導致細胞不正常增生，使得癌化形成(tumorigenesis)。假如上述過程發生在 MMR(mismatch repair)基因，促使突變的機率增加，更容易讓細胞走向癌化一途，如 Fig 7 及 Fig 8 所示(Robertson et al., 2000)。

而 cytosine 甲基化成為 5'-methylcytosine 的機轉是藉由 DNA 甲基化轉移酵素(DNA methyltransferase)，簡稱 DNMT；DNMT 上 cysteine residue 會鍵結在 cytosine 上 C-6 的位置，而造成相鄰 C-5 位置上電位的不平衡而產生負電荷。此舉吸引 S-adenosyl-methionine (SAM)上甲基(CH<sub>3</sub>)的結合，遂將甲基轉移鍵結到 cytosine 上 C-5 的位

置，最終轉變成為 5'-methylcytosine。若在細胞實驗中加入 cytosine 的類似物：5-aza-2'-deoxy-cytosine，則會抑制甲基化的生成，其作用機制如 Fig 9 所示(Juttermann et al., 1994 ; Robertson et al., 2001)。

DNA 甲基化會造成轉錄作用被抑制的結果。有一種蛋白：methylation-CpG-binding protein (MeCP)，會與 5'-methylcytosine 結合 (Free et al., 2001)，進而吸引 transcription co-repressor 與 deacetylase，造成組蛋白(Histone)的去乙酰化，並使得染色質緊縮，轉錄作用也隨之停止，其作用機制如 Fig 10 所示(Jones et al., 1999; Wade 2001; Tycko 2000)。腫瘤抑癌基因；如：pRb、VHL、p16<sup>INK4a</sup>、APC、BRAC1 等，其促進子區域上 CpG island 呈現高甲基化時，則會抑制腫瘤抑癌基因的轉錄作用，影響其正常功能的運作，最終導致癌症的產生(Momparler et al., 2000 ; Baylin et al., 1998 ; Tycko 2000)。

### 三、基因座異質性缺失(Loss of Heterozygosity ; LOH)

在正常的人類體細胞中，都具有成對的基因座(allele)，但是在細胞癌化的過程中，若失去其中一個基因座，這就是所謂的基因座缺失(loss of heterozygosity ; LOH)。一般來說，造成 LOH 的情形，可能透過下列各機制的運作：

- (A) 細胞在進行有絲分裂過程中，染色體發生了不分離的現象 (missegregation or non-disjunction) ，造成染色體不成對的結果，
- (B) 有絲分裂時，染色體發生重組的現象(recombination)的現象，造成基因座缺失。
- (C) 其中一個基因座發生缺失(deletion)的情形。

以上皆是造成 LOH 的可能原因(Cavenee et al., 1983 ; Chang et al., 2000)。LOH 的分析方式是使用廣泛分布在整個染色體中的微衛星序列(microsatellite sequence)，利用其與相鄰近基因的關聯性，間接地偵測與微衛星序列相近的基因座缺失情形。

#### 四、人類乳突狀病毒(Human papillomavirus ; HPV)與 p16 蛋白的關係

人類乳突狀病毒屬於巴波法病毒(papovavirus)成員，直徑只有 55 nm，基因體由 7.9kb 雙股環狀 DNA 組成，病毒外觀為正二十面體，無封套膜(envelope)，可產生 E1 E7 的功能性蛋白以及 L1 與 L2 的結構性蛋白。在此僅就 HPV 所產生的 onco-protein：E6 與 E7 蛋白做重點介紹。

- (1) HPV E6 蛋白：包含約 150 個 amino acid，高危險型的 HPV，如 HPV116、HPV18 E6 蛋白會與 p53 結合，促使 p53 經由 ubiquitin pathway 的路徑被降解掉，導致細胞的轉形。
- (2) HPV E7 蛋白：包含約 98 個 amino acid，高危險型的 HPV E7 蛋白與 pRb 的結合能力較強，進而促使 E<sub>2</sub>F 被釋放出來，導致細胞的增生，引發細胞的轉形。

目前已發現的人類乳突狀病毒約有 100 餘種，其分類標準是根據 E6、E7 及 L1 其 DNA 序列的差異性來加以區分。如果 E6、E7 及 L1 其 DNA 序列差異大於 10 %，則為不同型。感染生殖部位的 HPV 可依其轉形的能力而區分為低危險型(Low risk：HPV 6、11、42、43、44)及高危險型(Low risk：HPV16、18)，高危險型 HPV 具有致癌的能力；低危險型 HPV 則能力較差(Zur Hausen et al., 2000)。有研究指出，

在子宮頸癌細胞株中，HPV16/18 E7 存在時，可促使 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白過度表現，如 Fig 12 所示(Khleif et al., 1996；Sano et al., 1998)。而此一現象也在子宮頸癌組織切片中觀察得到(Milde-Langosch et al., 2001)。所以 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的過度表現也許在子宮頸切片與抹片中，可當作一種偵測子宮頸癌病變的生物指標(Klaes et al., 2001)。



## 肆、研究動機

過去本研究室發現台灣肺癌患者以免疫組織化學染色法分析 p53 抑癌蛋白，結果得知大多無法偵測到，且經過直接定序法分析其 DNA 突變的頻率，得知 p53 突變的比例為 12.7 % (19/149) (Yu et al., 2000)，低於其他國家的肺癌患者 20 - 49 % (Elin et al., 1996 ; Yukihiro et al., 1995)。而由其他研究結果指出，p16<sup>INK4a</sup> 基因的去活化在肺癌中發生的頻率很高 (Zochbauer-Muller et al., 2002)。故推測 p16<sup>INK4a</sup> 基因的去活化或許在台灣肺癌之致腫瘤化機制上扮演重要之角色。已知 p16 基因的去活化大多由 promoter hypermethylation、LOH 和基因突變等三種機制所致。由過去研究已知 p16 基因的 LOH 和 hypermethylation 與肺癌之形成有關。又知 p16 基因的 hypermethylation 與抽菸有關。而台灣女性肺癌患者大多為不抽菸者，因此假設不抽菸之女性肺癌之 p16 基因的去活化機制上，可能與男性肺癌患者不同。因此本研究之結果或許可提供 p16 基因的去活化機制的不同，而了解台灣女性肺癌之形成與環境暴露之可能關係。

## 伍、材料與方法

### 一、肺腫瘤組織

本次研究所選取 143 個非小細胞原發性肺組織，皆由台中榮民總醫院胸腔外科取得，而這些患者在 1993 年至 2001 年間進行手術。而此次選用之 143 位患者資料列於 Table 1。患者的平均年齡為 63.8 歲；男性有 100 位，比例為 69.9%；女性有 43 位，比例為 30.1%。而本實驗採用的腫瘤分期，是依據 TNM：即腫瘤大小 (tumor size)、是否有淋巴結轉移 (node transference)、以及是否有遠端轉移 (metastasis) 來決定其腫瘤分期。

## 二、材料與藥品

### 1. DNA 和 RNA 的製備

#### 1-1. DNA 製備

SDS (Sodium dodecyl sulfate)

EDTA (Ethylenedinitrilo tetra-acetic disodium salt)

NaCl (Sodium chloride)

Tris-base

NaOAc (Sodium acetate)

NaOH (Sodium hydroxide)

購自德國 E.Merk 公司

Phenol

Chloroform

Alcohol for bio-tech

購自台灣皓峰公司

Proteinase K

購自德國 Boehringer-Mannheine 公司

#### 1-2. RNA 製備

Rare RNA Kit

RNasin

購自美國 Gibco BRL 公司

DNase

MgCl<sub>2</sub>

Isopropanal

DEPC (Diethyl pyrocarbonate)

DTT (DL-dithiothreitol)

購自美國 Sigma 公司

## 2. 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry)

Xylene

Alcohol

購自台灣皓峰公司

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

NP-40

購自美國 Sigma 公司

Hematoxyline

Citrite acid

Tris

EDTA (Ethylenedinitrilo tetra-acetic disodium salt)

NaCl (Sodium chloride)

Entellan (封片膠)

購自德國 E.Merk 公司

P16 一次抗體

購自美國 Santa Cruz 公司

LSAB Kit

DAB

Primary Anti-body diluent

DaKo Pen

購自丹麥 Dako 公司

## 3. Methylation-Specific PCR (MS-PCR)

Calf thymas DNA

NaOH (Sodium hydroxide)

Hydroquinone

Sodium Bisulfite

Isopropanal

購自美國 Sigma 公司

Wizard DNA Clean-UP System

購自美國 Promega 公司

DyNAzyme™ II DNA polymerase

購自美國 Bio-Labs 公司

#### 4. Loss of Heterozygosity (LOH)

TBE Buffer

Acrylamide/Bis-acrylamide (19:1)

APS (Ammonium persulfate)

TEMED (N,N,N',N' -Tetramethylethylenediamine)

購自美國 Sigma 公司

Taq polymerase

購自台灣真興公司

#### 5. RT-PCR

M-MLV Reverse Transcriptase

100mM dNTP

購自美國 Promega 公司

Oligo primer

100bp Ladder

DyNAzyme™ II DNA polymerase

購自美國 Bio-Labs 公司

### 三、肺腫瘤組織切片之來源

肺癌患者腫瘤組織之切片由台中榮總病理部取得。將手術切除下來的肺腫瘤組織以 10 % 的福馬林固定，再以石臘包埋。將包埋好的組織以切片機切成每片厚度為 3-5  $\mu\text{m}$ ，再將切好的組織薄片泡過熱水展開後，放在玻片上，並置於 37  $^{\circ}\text{C}$  烘箱 14-16 個小時烘乾後，在乾燥區域保存以便日後進行組織免疫染色。

#### 四、免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry , 簡稱 IHC)

將製備好的組織玻片放於 55-60 烘箱約 10 分鐘，迅速泡入二甲苯(Xylene)中 20 分鐘，使組織完全脫臘。再依序浸於 100 %酒精 10 分鐘，95 %、85 %、75 %酒精各 5 分鐘，最後放入一次水中浸泡 30 秒，使組織覆水並洗去酒精。將組織切片浸泡在 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，作用 20-30 分鐘，此步驟目的在於避免組織中過氧化酵素(oxidase)干擾最後的呈色結果。接著放入 0.01M citric acid buffer (pH=6.0)中，以微波加熱 3 次，每次加熱 5 分鐘，待 citric acid buffer 冷卻後，泡在一次水 30 秒，即可將組織切片浸泡於 1 × PBS buffer 5 分鐘，此步驟目的是要將組織抗原呈現出來。接著以 LSAB, rabbit/mouse, HRP Kit (Dako corporation Carpinteria., CA)執行免疫組織化學染色。首先以 Dako pen (Dako corporation Carpinteria., CA)將組織的部分圈選出來，置於事先裝好水的潮濕盒中，再將 mouse monoclonal anti-P16 (SANTA CRUZ, CA)以 diluent buffer (Dako corporation Carpinteria., CA)稀釋 1:500 倍後，直接將稀釋的抗體滴在組織切片上，將潮濕盒置於 4 冰箱中使其作用隔夜(overnight)。之後用 1 × PBS buffer 洗 3 次，每次 5 分鐘。加入 biotinylated 二次抗體，於室溫作用 20 分鐘，再以 1 × PBS buffer 洗 3 次，每次 5 分鐘後，加入 streptavidin，於室溫作用 20 分鐘。跟先前的步驟一樣：以 1 × PBS buffer 洗 3 次，每次 5 分鐘。接著用 DAB

呈色(取一毫升的 DAB buffer 加入一滴的 DAB substrate)快速覆蓋組織切片，作用 5-10 分鐘，有呈色反應立即以一次水清洗呈色劑。呈色後的組織切片須以 Hematoxylin (Merck)做背景染色，以水沖 5 分鐘，使背景呈藍紫色以方便觀察染色結果。最後，將組織切片依序脫水 95 %、100 % 酒精各 3 分鐘，放入二甲苯中 2-5 分鐘，再以阿拉伯膠 (Merck)封片。

P16<sup>INK4a</sup> 蛋白免疫組織染色結果的判讀是經由 3 位以上人士 (至少包括一位臨床病理醫師)，依照 DAB 於組織呈色的範圍，來判斷蛋白表現的情形。P16 蛋白表現在細胞核內，若是所有腫瘤細胞都沒有染到，以(-)表示；若表現區域小於 10 % 腫瘤區域則為(+)，若表現區域大於 10 % 卻小於 50 % 的腫瘤區域則為(++)，若表現區域大於 50 % 的腫瘤區域則為(+++)。



## 五、肺組織 DNA 的萃取

將肺癌病患肺組織置於含有 0.5 ml lysis buffer (10 mM Tris buffer pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5 % SDS, 25 mM EDTA pH 8.0)的 microtube 中，先將組織剪碎，再加入 10 mg/ml 的 proteinase K 10 $\mu$ l，置於 56 $^{\circ}$ C 作用 18 個小時，使組織完全水解。再加入 0.5 ml phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1)均勻混和後，以 12000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至一新的 microtube 中，重複以上步驟 1-2 次。再以 chloroform / isoamyl alcohol (24:1)萃取一次，洗去殘留的 phenol。取上清液加入 1 / 10 倍體積的 3M NaOAc 與 2 倍體積的 100 % 酒精，均勻混和後，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘，以沉澱 DNA。以 12000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，再加入 75 % 酒精洗去多餘的鹽類，最後將 DNA 溶於滅菌水並保存至 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。之後以紫外線光譜儀測定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其吸光值 A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> 的比值應在 1.6 到 1.8 之間。DNA 的濃度以下列公式計算：DNA (  $\mu$ g / ml ) = A<sub>260</sub>  $\times$  50  $\times$  稀釋倍數。

## 六、Promoter Hypermethylation 的分析

本研究利用 Methylation-Specific PCR (MSP) 的方法來檢測 p16<sup>INK4a</sup> 腫瘤抑癌基因其促進子甲基化的情形。MSP 的實驗原理是運用 Sodium bisulfite 化學修飾(chemical modification)的能力，將 DNA 上的 cytosine 轉變成 uracil。假如 cytosine 原本即具有甲基化(5-methylcytosine)的狀態時，Sodium bisulfite 則無法將其轉變成 uracil 而依然保持 cytosine 的型式，之後再使用 primer 將甲基化的 DNA 序列擴大(amplification)，進一步確認其為甲基化(methylated) DNA。此外並設計另一組 primer，針對原本即無甲基化而由 cytosine 轉變成 uracil 的 DNA，進行 DNA 序列擴大，而得知其為未甲基化(unmethylated)的 DNA (Herman et al., 1996)。本實驗所使用的肺腫瘤組織 DNA 可能包含了肺腫瘤組織與周邊正常組織 DNA，所以甲基化與未甲基化的情形皆可能在同一個病人中出現。兩組 primer 序列如下：

p16-M: Sense- 5' TTATTAGAGGGTGGGGC GGATCGC<sup>3'</sup>  
Antisense- 5' GACCCCGAACCGCGACCGTAA<sup>3'</sup>

p16-U: Sense- 5' TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT<sup>3'</sup>  
Antisense- 5' CAACCCCAAACCACAACCATAA<sup>3'</sup>

Bisulfite modification: 取 6  $\mu$ g (濃度 1  $\mu$ g /  $\mu$ l) tumor DNA 加入 4

1 g calf thymus DNA (當作 carrier) 15  $\mu$ l 二次水及 25  $\mu$ l 0.4N NaOH (最終濃度 0.2 N) 混和均勻後，置於熱循環機反應 37  $^{\circ}$ C 10 分鐘。取出，加入 30  $\mu$ l 10mM Hydroquinone 與 520  $\mu$ l 3M pH 5.0 的 sodium bisulfite 混和均勻，置於乾浴加熱器(dry bath) 50  $^{\circ}$ C 16 個小時。接著用 Wizard DNA Clean-Up System 純化 DNA，其過程如說明書所示，稀釋成 50  $\mu$ l 的 DNA 水溶液。最後加入 50  $\mu$ l 0.6 N NaOH (最終濃度 0.3 N) 靜置室溫 5-10 分鐘，以終止 modification 的作用。並以酒精沉澱法將 DNA 萃取出來，溶於 10-15  $\mu$ l 二次水中，以供日後 PCR 反應之用。

PCR 反應如下：DNA 1  $\mu$ l、10 mM dNTP 1  $\mu$ l、10  $\times$  PCR reaction buffer 5  $\mu$ l、2U /  $\mu$ l DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNA polymerase 0.5  $\mu$ l 及 10 mM primer 各 1  $\mu$ l，最後以滅菌水將體積補到 50  $\mu$ l。條件如下：94  $^{\circ}$ C 5 分鐘後，94  $^{\circ}$ C 1 分鐘、Tm 50 秒、72  $^{\circ}$ C 50 秒，以熱循環機重複 40 次，最後以 72  $^{\circ}$ C 10 分鐘，降到 4  $^{\circ}$ C 時終止反應。PCR 產物經 2% agarose gel 電泳後，再以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘，再用紫外光數位顯像儀拍照電泳的結果。

註：PCR 產物長度及 Tm 的溫度分述如下：

	PCR 產物長度	Tm
p16-M :	150 bp	65
p16-U :	151 bp	60

## 七、Loss of Heterozygosity ( LOH ) 的分析

利用 3 組 microsatellite marker : D9S942、 D9S1748、 D9S1749 , 其相關位置 , 如 Fig 11 所示。針對 p16<sup>INK4a</sup> 腫瘤抑癌基因上 9p21 染色體其基因座缺失( LOH )的偵測。其 primer 序列如下 :

D9S942 :        Sense- 5' GCAAGATTCCAAACAGTA 3'  
                  Antisense- 5' CTCATCCTGCGGAAACCATT 3'

D9S1748 :        Sense- 5' CACCTCAGAAGTCAGTGAGT 3'  
                  Antisense- 5' GTGCTTGAAATACACCTTTCC 3'

D9S1749 :        Sense- 5' AGGAGAGGGTACGCTTGCAA 3'  
                  Antisense- 5' TACAGGGTGCGGGTGCAGATAA 3'

首先分別從肺癌腫瘤及其鄰近週邊正常的組織中抽取 DNA , 再利用上述 3 組 microsatellite marker 進行 PCR 反應。其反應如下 : DNA 100 ng (濃度 1 ìg / ìl) , 10 mM dNTP 1 ìl , 10 × PCR reaction buffer 5 ìl , 2.5U Taq polymerase 0.5 ìl 及 10 mM primer 各 1 ìl , 最後以滅菌水將體積補到 50 ìl , 條件如下 : 94 5 分鐘後 , 94 1 分鐘、 Tm 50 秒、 72 50 秒 , 以熱循環機重複 35 次 , 最後以 72 10 分鐘 , 降到 4 時終止反應。取肺癌腫瘤及其鄰近週邊正常組織 DNA 為一組之 PCR 產物各 15 ìl , 以 8 % 的 polyacrylamide gel 進行直立電泳

後，以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘，再用紫外光數位顯像儀拍照電泳的結果。基因座缺失的判斷是以肺癌腫瘤鄰近週邊正常組織的 DNA repeat segmentation 為準，而將肺癌腫瘤的 DNA repeat segmentation 與之比較。若肺癌腫瘤的 DNA repeat segmentation 有消失的情形產生時，此即為 LOH。

註：PCR 產物長度及 T<sub>m</sub> 的溫度分述如下：

	PCR 產物長度	T <sub>m</sub>
D9S942 :	100 bp	54
D9S1748 :	130 bp	56
D9S1749 :	120 bp	54

## 八、人類乳突狀病毒 ( Human papilloma virus , HPV ) 種類之偵測

利用 Nested PCR 偵測肺癌腫瘤中 HPV16 / 18 存在與否。首先以第一次 PCR 的方式,用 MY 09 與 MY 11 這對 primer 夾出 HPV 上 L 1 的片段,再用第二次 PCR 以 type- specific primer 確認 L 1 片段上 HPV16 / 18 特定的序列。primer 設計如下:

Consensus primer	5' → 3'	PCR product
MY 09	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	450 bp
MY 11	CGTCCMARRGGAWACTGATC	
Nested primer		
HPV16 UP	TACTAACTTTAAGGAGTACC	223 bp
HPV16 DN	GTGTATGTTTTTGACAAGCAATT	
HPV18 UP	CAAATTTAAGCAGTATAGC	193 bp
HPV18 DN	TTGTACAAAACGATATGTATCCA	

第一次 PCR 反應如下: DNA 1  $\mu$ l、10 mM dNTP 1  $\mu$ l、10  $\times$  PCR reaction buffer 5  $\mu$ l、2U /  $\mu$ l DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNA polymerase 0.5  $\mu$ l 及 10 mM consensus primer 各 1  $\mu$ l, 最後以滅菌水將體積補到 50  $\mu$ l。條件如下: 94  $^{\circ}$ C 10 分鐘後, 94  $^{\circ}$ C 1 分鐘、55  $^{\circ}$ C 2 分鐘、72  $^{\circ}$ C 1 分鐘, 以熱循環機重複 35 次, 最後以 72  $^{\circ}$ C 10 分鐘, 降到 4  $^{\circ}$ C 時終止反應。

第二次 PCR 反應如下：第一次 PCR product 5  $\mu$ l、10 mM dNTP 1  $\mu$ l、10  $\times$  PCR reaction buffer 5  $\mu$ l、2U /  $\mu$ l DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNA polymerase 0.5  $\mu$ l 及 10 mM nested primer 各 1  $\mu$ l，最後以滅菌水將體積補到 50  $\mu$ l。條件如下：94  $^{\circ}$ C 5 分鐘後，94  $^{\circ}$ C 40 秒、54  $^{\circ}$ C 1 分鐘、72  $^{\circ}$ C 1 分鐘，以熱循環機重複 35 次，最後以 72  $^{\circ}$ C 10 分鐘，降到 4  $^{\circ}$ C 時終止反應。產物經 2 % agarose gel 電泳後，再以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘，再用紫外光數位顯像儀拍照電泳的結果。

## 九、肺組織 RNA 萃取與純化

### 1. RNA 萃取

將適當大小之組織,約 50-100 mg,置於磨棒中。加入 Rare RNA 1 ml 將組織磨碎後,移至 1.5 ml microtube,於冰上反應 20-30 分鐘以便水解組織。待組織完全水解後(Rare RNA 呈現澄清狀時),加入 200  $\mu$ l 氯仿(chloroform)混和均勻,以 12000 rpm 離心 10 分鐘後,取出上清液加入 500  $\mu$ l isopropanol 於室溫反應 15 分鐘並可加入 LPA (linear polyacrylamide)以幫助 RNA 沉澱。經 12000 rpm 離心 10 分鐘後,除去上清液,加入 1ml 75 % 酒精去除殘餘的鹽類與 isopropanol,經離心留下 RNA 沉澱物,溶於 50  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O。

### 2. RNA 純化

將溶於 50  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O 的 RNA,加入 10  $\mu$ l 100 mM MgCl<sub>2</sub> / 1M DTT、1  $\mu$ l Rnasin (25-50U)、1  $\mu$ l Dnase (6.94 mg / ml)、40  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O 於 37 °C 反應 30 分鐘以除去多餘的 DNA,並以 5 mM EDTA、750 mM sodium acetate 及 0.1 % SDS 終止 Dnase 反應。加入 phenol / chloroform 去除蛋白,以 12000 rpm 離心 15 分鐘後,取出上清液加入 500  $\mu$ l isopropanol 於室溫反應 15 分鐘幫助 RNA 沉澱。經 12000 rpm 離心 10 分鐘後,除去上清液,加入 1ml 75 % 酒精去除殘餘的鹽類與 isopropanol,經離心留下 RNA 沉澱物,溶於 50  $\mu$ l DEPC



H<sub>2</sub>O 用於 RT-PCR 分析之前先以 denature agarose gel 確定 18S 及 28S rRNA 是否存在，以確保 RNA 品質。以紫外線光譜儀測定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> 比值應在 1.7 至 1.9 之間 RNA 的濃度以下列公式計算：RNA ( ì g / ml ) = A<sub>260</sub> × 40 × 稀釋倍數。

## 十、RT-PCR 與 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表現

取 5 µg RNA 以 200 pmole / µl oligo dT 1 µl 為 primer 並加入 8 µl DEPC H<sub>2</sub>O , 於 72 °C 反應 10 分鐘 , 使 oligo dT 接合到 RNA 模板上。接著將溫度降到 4 °C , 加入 4 µl 反轉錄酵素反應緩衝劑(reaction buffer) 及 1 µl 10 mM dNTP。之後把溫度升到 42 °C 作用 2 分鐘時 , 加入 1 µl 反轉錄酵素(reverse transcriptase) , 在 42 °C 作用 90 分鐘後 , 4 °C 1 分鐘、65 °C 15 分鐘 , 最後以 4 °C 終止反應。

分析 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 表現所採用的 primer 如下 :

p16<sup>INK4a</sup> 180 bp

Sense: 5'-GCTGCCCAACGCACCGAATA-3'

Antisense: 5'-ACCACCAGCGTGTCCAGGAA-3'

PCR 反應如下 : cDNA 1 µl 0.5 mM dNTP 1 µl 10X PCR reaction buffer 5 µl 2.5U Taq polymerase 及 0.5 mM primer 各 1 µl , 最後以滅菌水將體積補到 50 µl。置於熱循環儀中 , 條件如下 : 94 °C 5 分鐘後 , 94 °C 1 分鐘 55 °C 1 分鐘 72 °C 1 分鐘 , 重複 35 次 , 最後以 72 °C 10 分鐘 , 降到 4 °C 時終止反應。產物經 2 % agarose gel 電泳後 , 再以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘 , 再用紫外光數位顯像儀拍照電泳的結果。

## 十一、統計分析

以 SPSS 統計軟體進行 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現、p16<sup>INK4a</sup> LOH、p16<sup>INK4a</sup> mRNA 及 p16<sup>INK4a</sup> promoter hypermethylation 的統計，分析其與臨床因子之間的關係。以卡方( $\chi^2$ -test) 來分析其間是否有差異。

## 陸、結果

### 一、p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現與肺腫瘤臨床因子之相關性

過去本研究室以免疫組織化學法分析 p53 抑癌蛋白，發現女性肺腫瘤組織大多無法偵測到 p53 蛋白的表現。而直接定序法分析 p53 基因突變的頻率又顯著低於其他研究 (Yu et al., 2000)。而由其他研究結果指出，p16<sup>INK4a</sup> 基因的去活化在肺癌中發生的頻率很高 (Zochbauer-Muller et al., 2002)。因此本研究先以免疫組織化學法分析台灣地區肺癌患者 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現，以了解 p16<sup>INK4a</sup> 基因的去活化，在不同性別之肺癌形成上，是否扮演不同之角色？p16<sup>INK4a</sup> 免疫組織染色法分析的代表圖如 Fig 1 所示，p16 蛋白都表現於腫瘤細胞的細胞核中。Table 2 的結果顯示，有 76.9 % (110 of 143) 的肺癌病患沒有偵測到 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現，僅有 33 個肺癌腫瘤具有 p16 蛋白之表現。當 p16 蛋白表現與腫瘤臨床因子間之相關性分析時發現，在統計上與所有之臨床因子都沒有顯著相關性，包括年齡、性別、腫瘤分化程度、腫瘤形式、腫瘤分期、腫瘤大小、淋巴結轉移和抽菸因子等。其中僅有年齡大於 66 歲者之 p16 蛋白之表現頻率 (18.8%, 13 of 69) 較低於年齡小於 66 歲之肺癌患者 (27.1%, 20 of 74) 以及腫瘤形式為肺腺癌者 (25%, 20 of 80) 較鱗狀上皮癌者 (20.6%, 13 of 63) 有稍高之 p16 蛋白表現率，但都沒有達到統計意義。

## 二、p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與肺腫瘤臨床因子之相關性和對 p16 蛋白表現之影響

已知 p16<sup>INK4a</sup> 基因不活化的機制主要包括促進子高度甲基化 (promoter hypermethylation)、基因座缺失 (Loss of Heterozygosity ; LOH) 和基因突變。但由過去之研究結果顯示，p16 基因突變頻率造成 p16 的去活化的重要性較 hypermethylation 和 LOH 為低 (Zochbauer-Muller et al., 2002 ; Betticher et al., 1997 ; Gazzeri et al., 1998)。因此本研究將探討不同性別肺癌患者之 p16 蛋白不表現，在經由 hypermethylation 或 LOH，造成 p16 基因的去活化之機制上，是否有些不同？台灣地區肺癌病患有 76.9 % (110 of 143) 沒有偵測到 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現。因此首先從 hypermethylation 的分析，了解是否參與 p16 蛋白之不表現。以及了解 p16 hypermethylation 與肺腫瘤臨床因子間之相關性。

### (一)、肺癌患者 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與臨床因子之相關性

本研究以 methylation-Specific PCR (MSP) 的方法分析 143 個肺癌患者之 p16 基因是否發生 hypermethylation？如 Fig 2 所示。由 Table 3 得知 32.9 % (47 of 143) 的肺癌患者具有 hypermethylation，而此 hypermethylation 與肺腫瘤之臨床因子相關性之分析結果顯示，除

了淋巴結轉移因子之外，其餘的臨床因子與 p16 hypermethylation 都沒有相關性。即肺癌患者有淋巴結轉移者 (N = 1, 2, 3) 之 p16 hypermethylation 頻率，顯著高於淋巴結不轉移者 (N = 0, P = 0.031)。其次在性別上，發現女性肺癌患者之 p16 hypermethylation 的頻率 (41.7% , 18 of 43) 稍高於男性患者 (29.0% , 29 of 100) ，但並沒有達到統計意義 (P = 0.133)。同樣的在腫瘤分期方面，晚期病患 (Stage 2 & 3) p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 的頻率 37.4% (34 of 91) 較早期肺癌患者 (Stage 1) 為高 (25% , 13 of 52) ，亦未達統計上的意義 (P = 0.130)。因此，在本研究中發現，p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與肺癌上淋巴轉移較有關。

## (二)、肺癌患者 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與蛋白表現之相關性

由 Table 3 的結果得知，p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 表現，有高達 87 % (41 of 47) 的患者之 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白為不表現，而 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白有表現的患者中，有 82 % (27 of 33) 的患者之 p16<sup>INK4a</sup> 沒有 hypermethylation，兩者間在統計上有顯著意義 (P = 0.041)。因此 p16<sup>INK4a</sup> 基因 hypermethylation 對台灣肺腫瘤 p16 蛋白的表現與否，具有重要的影響。

### 三、p16<sup>INK4a</sup> LOH 與肺腫瘤之臨床因子間的相關性和對 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現之影響

#### (一)、p16<sup>INK4a</sup> LOH 與臨床因子之相關性分析

為了解肺癌患者中，染色體 9p21 上 p16<sup>INK4a</sup> LOH 是否參與 p16 蛋白之不表現，我們以 D9S942、D9S1748、D9S1749 等三個 microsatellite marker 做 143 個肺腫瘤組織之 LOH 分析，但其中有五個肺腫瘤組織之 LOH 分析結果，無法判定其是否發生 LOH，因此將此五個樣品其移除，不列入與臨床因子之相關性分析。如 Fig 3 所示。1 號病患在 D9S17492 的位置上，由圖可看出相對於腫瘤周圍之正常組織，腫瘤組織發 LOH 的現象。而 2 號病患在 D9S942 與 D9S1748 位置上皆有 LOH 的現象。由 Table 4 結果顯示，29 % (40 of 138) 肺癌患者的染色體 9p21 上 p16<sup>INK4a</sup> 區域發生 LOH。在與肺腫瘤臨床因子之相關性的分析上發現，與性別、腫瘤形式以及抽菸等三種因子有顯著的相關性，而與其餘臨床因子之間均無統計上之相關性。在性別方面，男性、女性病患 p16<sup>INK4a</sup> LOH 的頻率分別為 37.1 % (36 of 97) 與 9.8% (4 of 41)，男性病患 p16<sup>INK4a</sup> LOH 的比例顯著高於女性病患 (P = 0.001)。腫瘤形式方面，AD、SQ 的病患 p16<sup>INK4a</sup> LOH 的比例分別為 19.3% (15/78) 與 41.7% (25/60)，SQ 的病患 p16<sup>INK4a</sup> LOH 的比例顯

著高於 AD 的病患( $P = 0.004$ )。不抽菸者與抽菸者之  $p16^{\text{INK4a}}$  LOH 的比例分別為 19.3% (15 of 78) 與 41.7% (25 of 60), 抽菸者  $p16^{\text{INK4a}}$  LOH 的比例高於不抽菸者 ( $P = 0.004$ )。因此不抽菸女性具有肺腺癌之患者相對於抽菸男性具有鱗狀上皮癌之肺癌患者, 有較低比例的  $p16$  區域之 LOH 發生。

## (二)、台灣地區肺癌患者 $p16^{\text{INK4a}}$ LOH 與其蛋白表現之相關性

由 Table 4 結果得知, 有  $p16^{\text{INK4a}}$  LOH 的患者,  $p16^{\text{INK4a}}$  蛋白不表現的比例為 77.5% (31 of 40),  $p16^{\text{INK4a}}$  蛋白表現的病患有 71.9% (23 of 32) 沒有  $p16^{\text{INK4a}}$  LOH 的情形, 其間沒有差異 ( $P=0.903$ )。因此  $p16^{\text{INK4a}}$  LOH 與  $p16$  蛋白表現之影響, 可能沒有  $p16$  hypermethylation 的影響來的重要。

## 四、 $p16^{\text{INK4a}}$ hypermethylation 和 LOH 參與抽菸男性、不抽菸男、女性肺癌患者 $p16$ 蛋白表現之相關性分析

由以上之研究結果得知, 性別與抽菸可能有交互作用, 而影響肺腫瘤中  $p16$  蛋白之表現。本研究為釐清抽菸因子在性別的影響, 因此將全部 143 個肺癌患者區分成不抽菸女性、不抽菸男性、抽菸男性等三組, 分別探討  $p16^{\text{INK4a}}$  hypermethylation、LOH 對這三組肺癌患者



p16 蛋白的表現與否，是否 hypermethylation 和 LOH 可能有不同的貢獻度。結果如 Table 5 所示，不抽菸女性甲基化的比例最高，約有 42 % (18 of 43)。而抽菸男性次高，有 34 % (21 of 62)。不抽菸男性則最低，只有 21 % (8 of 38)。比較這三組之間的差異時發現，p16<sup>INK4a</sup> 促進子高度甲基化在不抽菸女性與不抽菸男性肺癌患者間有顯著的差異 (42 % for female ; 21 % for male , P = 0.045) ，而在抽菸與不抽菸之男性肺癌患者間，卻沒有統計上的差異，這結果顯示性別因子會影響 p16 hypermethylation ，造成 p16 蛋白之不表現，而非抽菸因子。由 Table 5 結果顯示，LOH 的比例以抽菸男性最高 (42%) ，不抽菸男性次之 (30%) ，而不抽菸女性則最低 (10 %) 。三者間有統計上的顯著差異 (P = 0.002) 。抽菸男性患者 LOH 的現象，確實比不抽菸女性患者來的普遍 (42 % for smoking male ; 10 % for nonsmoking female , P<0.001) ，且不抽菸男性患者也高於不抽菸女性 (30 % for nonsmoking male ; 10% for nonsmoking female , P= 0.025) 。

進一步比較 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 對三組肺癌患者 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現的影響。Table 6 的結果發現，不抽菸女性 p16 蛋白不表現的有 31 位患者；而此 31 位中有 16 位具有促進子高度甲基化，因此以 hypermethylation 約可解釋 52% ( 16 of 31) 的不抽菸女性 p16 蛋白之不表現。在不抽菸男性中，則僅能解釋 23 % (7 of 31) 的 p16 蛋白之不表

現，不到不抽菸女性患者的一半。比較三組間的相關性時發現， $p16^{INK4a}$  促進子高度甲基化，對於不抽菸女性與不抽菸男性的  $p16^{INK4a}$  蛋白不表現呈現顯著差異 (52 % for nonsmoking female ; 23 % for nonsmoking male ,  $P=0.029$ )，而不抽菸男性與抽菸男性則無此差異性。由此結果得知， $p16^{INK4a}$  hypermethylation 對男、女性患者間的影響有性別上的差異，與抽菸因子則無關。

這三組  $p16^{INK4a}$  蛋白的表現與  $p16^{INK4a}$  區域 LOH 之相關性分析結果顯示，抽菸男性患者之 LOH 造成  $p16^{INK4a}$  蛋白不表現的比例為 39 % (18 of 46)，顯著高於不抽菸男性的 33 % (10 of 30) 及不抽菸女性的 10% (3 of 30)。三組間具有統計上之顯著差異 ( $P=0.018$ )。總之，由 Table 5 與 Table 6 之結果獲知， $p16^{INK4a}$  hypermethylation 對不抽菸女性  $p16^{INK4a}$  蛋白不表現的影響，較不抽菸男性、抽菸男性為大，且有性別上差異。而  $p16^{INK4a}$  區域 LOH 在男性較常發生，特別是抽菸男性，比不抽菸女性的比例高的多，在性別上也呈現顯著差異。因此男性肺癌患者之  $p16$  蛋白不表現，可能主要是經由 LOH，而女性肺癌患者則主要是經由 hypermethylation 而造成  $p16$  蛋白之不表現。且性別對  $p16^{INK4a}$  hypermethylation 的影響可能較抽菸為重要。這是本研究最主要的發現。

## 五、p16<sup>INK4a</sup> mRNA 與 hypermethylation、蛋白表現之相關性

由本研究獲知, hypermethylation 與蛋白的不表現呈現顯著差異( $P = 0.041$ )。為了確定 hypermethylation 分析的正確性,本研究以 RT-PCR 的方法,進一步分析 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表現與 hypermethylation 的相關性。RT-PCR 的代表圖如 Fig 4 所示。以 HeLa 細胞株當做 positive control, Line 4, 5 即 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 有表現的結果。而 p16<sup>INK4a</sup> mRNA 的表現與 hypermethylation 在統計上的相關性如 Table 3 所示。在 mRNA 有表現的 9 位病患中,皆無 hypermethylation 的現象,且有顯著的差異性 ( $P = 0.027$ )。進一步分析不抽菸患者, p16<sup>INK4a</sup> mRNA 表現與 hypermethylation 的關係。結果得知, mRNA 的表現與 hypermethylation 的現象也具有相關性 ( $P = 0.029$ , 數據未顯示)。由此獲知, hypermethylation 確實會干擾轉錄因子與啟動子之結合,而影響轉錄作用。而 mRNA 與蛋白間的關係如 Table 2 所示,在 mRNA 有表現的 9 位病患中,具蛋白表現者有 6 位 (66.7%),在統計上具顯著之相關性 ( $P = 0.001$ )。因此本研究分析之 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 確實會影響其蛋白的表現。

## 六、HPV16/18 與 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現相關性之分析

由 Klaes (2001) 等人的研究發現，在子宮頸癌中，高危險性 (high risk) 種類 HPV 的存在，會促使 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白過度表現。在本研究中藉此探討肺癌病患中，HPV16/18 對 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現是否有此關係存在，以確認 IHC 實驗數據的準確性，同時亦可再次確認 HPV16/18 感染與台灣肺癌形成之相關性。HPV16/18 的代表圖如 Fig 5. 所示，以 Nested PCR 的方式，先用 MY 09 與 MY 11 這對 primer 夾出 HPV 上 L 1 的片段，再用第二次 PCR 以 type-specific primer 確認 L 1 片段上 HPV16 / 18 特定的序列。Lane 2, 3, 5, 7, 11, 12 有 HPV 16 的表現。Lane 19, 27 則有 HPV 18 的表現。結果如 Table 7 所示。在 143 個病患中，p16<sup>INK4a</sup> 蛋白有表現者 33 位，其中 25 位具有 HPV16 或 HPV 18 的感染，而此結果與 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現有顯著的相關性 (P = 0.002)。因此 p16 蛋白之表現與 HPV 16/18 的感染有關。由此結果可推測本實驗之 p16 免疫組織染色的正確性。

## 柒、討論

### 一、p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現與其他各國的比較

從 IHC 實驗結果得知，有 23.1 % (33/143) 的肺癌病患 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白有表現。在其他非小細胞肺癌的相關研究中，約有 37-73% 的肺癌病患可以偵測到 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現，如 Table 8 所示。各國的研究結果皆有些不同，本研究結果低於與其他研究的數據，可能是由於採用 p16<sup>INK4a</sup> 抗體的品牌不同，或是 IHC 實驗條件上的差異所致。而人種的差異、樣本數的大小、男、女性組成的比例，都可能影響實驗的結果。腫瘤形式上，所有研究都顯示 AD 病患蛋白表現率高於 SQ 病患，而本研究亦有同樣的傾向，但兩者之差距較低。在性別上，美國、日本女性 p16 患者蛋白表現率高於男性，本研究亦有相同的結果。但本研究中，抽菸者與不抽菸者蛋白表現比例相近，故推測可能有其他因子影響不抽菸者蛋白不表現的現象。由 Sano(1998) 等人發現 HPV16/18 會促使 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白過度表現。本研究結果亦發現肺癌患者有 HPV16/18 的感染者 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白表現率較沒有感染者高 (P=0.002)。因此 HPV16 /18 感染可能藉由 E7 致癌蛋白將 Rb 蛋白降解掉，使 E<sub>2</sub>F 游離出來，而促進 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現 (Klaes et al., 2001)。由以上可知，台灣女性肺癌患者有較高之 p16 蛋白表現，可

能與 HPV 16/18 感染有關。

有研究指出，p16 與 Rb 蛋白的關係，大多呈現負相關的現象 (Kashiwabara et al., 1998)。但由本實驗室先前研究獲知，p16 與 Rb 蛋白以兩者皆不表現佔大多數。所以由 HPV 16/18 的感染推測，除了 p16 蛋白參與 Rb 蛋白不表現之外，HPV 16/18 E7 也參與 Rb 蛋白降解的機制，使得 E<sub>2</sub>F 游離出來，並促進 p16<sup>INK4a</sup> 蛋白的表現，如 Fig 12 所示。

## 二、p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與其他各國的比較

由 Table 9 可知，Kim (2001) 等人在 185 個非小細胞肺癌病患中發現，抽菸者若具有較高的抽菸包年數、抽菸年數情形下，hypermethylation 的比例較高，但本研究的結果卻沒有類似的發現。本研究發現台灣不抽菸之女性肺癌患者 hypermethylation 的頻率 (42%) 較抽菸男性 (34%) 還要高。這結果顯示，除了抽菸之外，還有其他的環境暴露因子參與 p16 基因的 hypermethylation。例如病毒感染 (Doerfler et al., 1995 ; Ambinder et al., 1999) ; 特殊致癌物之暴露，例如烹調油煙暴露與中國女性肺癌之相關性 (Koo et al., 1990 ; Ko et al., 1997, 2000 ; Yang et al., 1998 ; 2000) ，可能造成不同地區的基因 hypermethylation 的能力不同。最近本研究室發現台灣女性肺癌

之形成與 HPV 16/18 感染有關，因此推測台灣女性肺癌有較高之 HPV 感染可能參與 p16 基因之 hypermethylation。但須進一步研究。

Kim (2001)發現 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 在 Stage I 之 AD 病患可做為預後指標，即有 p16 hypermethylation 的患者之預後較沒有 hypermethylation 的病患差，但在晚期肺癌病患，則無此發現。本研究亦對肺癌患者做三年存活率的分析，結果僅在女性肺癌患者發現具有 hypermethylation 患者之存活率(10%) 較沒有 hypermethylation 患者的存活率低 (21%)。因此 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 對女性肺癌之腫瘤化可能扮演較重要的角色。

### 三、p16<sup>INK4a</sup> LOH 與其他研究的比較

p16<sup>INK4a</sup> 基因位於染色體 9p21 的位置。過去研究發現非小細胞肺癌病患在染色體 9p21，時常發生 LOH 的現象 (18-70%)。由本研究在 138 個樣本中有 40 個樣本有 LOH 發生(29%)。與 Table 10 中所列之研究結果 (29-61%) 比較，本研究的 LOH 發生頻率偏低，但與同樣以 51 個台灣肺癌患者為樣本所做之結果一致 (Chen et al., 2002)。本研究以最接近 p16 基因的三種 microsatellite marker 來進行 LOH 的分析 而其他研究除了以此三種 marker 之外，還用其它離 p16 基因較遠之 marker 來偵測 LOH 的發生。另外，本實驗所使用的 DNA

並非經由 microdissection 處理，而是直接使用腫瘤組織 DNA，因此可能會有正常組織 DNA 而干擾 LOH 的偵測。但本研究之結果與過去研究，例如 LOH 與性別、腫瘤形式、抽菸與否等臨床因子等有相關之發現一樣。但有趣的是發現，本研究女性肺癌之 LOH 之頻率是所有過去研究中最底的，而本研究之樣本數遠高於其他研究。因此台灣女性肺癌患者之 p16 基因的去活化之機制上，LOH 可能扮演較不重要之角色。

#### 四、p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與 LOH 在性別上的差異對 p16<sup>INK4a</sup> 去活化的比較

由本研究結果發現，不抽菸台灣女性肺癌患者之 p16<sup>INK4a</sup> 基因去活化的機制以 hypermethylation 為主；而男性，尤其是抽菸男性，則以 LOH 為主，hypermethylation 為輔，所以 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 在不抽菸女性致癌過程中，可能扮演著一個重要的角色，使得 p16<sup>INK4a</sup> 基因去活化的機制在性別上有所不同。Sanchez-Cespedes (2001b) 等人發現抽菸者與不抽菸者 p16<sup>INK4a</sup> 基因不活化的機制有差異。抽菸者主要是以 LOH 為主，不抽菸者則以 hypermethylation 為主，但由於該研究之樣本數僅有 14 位不抽菸之肺癌患者，因此並沒有達到統計意義。而本研究因不抽菸肺癌患者的比例較國外高的多，因此發現不抽



菸肺癌患者，尤其是女性患者之 p16<sup>INK4a</sup> 去活化主要是以 p16 hypermethylation 之機制所致。但有趣的是，同樣是不抽菸之男性肺癌患者卻僅有 23% 的患者之 p16 蛋白不表現，可用 hypermethylation 來解釋，而女性肺癌患者則有 52% 的患者能以 hypermethylation 來解釋，在性別上有顯著的差異 (P = 0.029)。但在抽菸與不抽菸之男性肺癌患者間卻沒有差異 (38% vs. 23%, P = 0.330)。因此性別對 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 的影響可能較抽菸為重要。這是本研究首要發現，就我們所知，尚未有其他研究報告有類似的發現。

香菸中含有許多致癌物質，如 BaP、NNK、PAH 等。而 BaP 的代謝產物 BPDE 可產生 DNA 鍵結物，誘發 DNA 單股斷裂 (Nakayama et al., 1985)。因此 LOH 在抽菸者中較不抽菸者常發生。雖然沒有直接的證據指出，抽菸可導致 DNA hypermethylation 的產生，但不論是臨床的研究還是在動物實驗，都發現 hypermethylation 與香菸致癌物暴露有關 (Eguchi et al., 1997 ; Kim et al., 2001 ; Swafford et al., 1997)。本研究抽菸男性不論是 hypermethylation 或是 LOH，皆有 34% 及 42% (Table 5) 的高發生比例。而抽菸男性受這兩種機制影響的總比例約 74% (46/62 ; 其中有 9 人兩者皆有)。因此抽菸對於 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 或是 LOH 有一定程度的影響。在不抽菸者方面，hypermethylation 的比例高於 LOH (32% hypermethylation , 19%

LOH, Table 5); 尤其是不抽菸女性, hypermethylation 的比例 (42%) 明顯高於不抽菸男性 (21%)。而 LOH (10 %) 則遠低於不抽菸男性 (30%)。而不抽菸女性受這兩種機制影響的總比例約 51% (22/43; 其中有 1 人兩者皆有)。因此不抽菸女性 p16<sup>INK4a</sup> 基因不活化主要以 hypermethylation 造成。

#### 五、不抽菸女性肺癌患者 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 與環境暴露之可能關係

本研究發現 p16<sup>INK4a</sup> hypermethylation 在性別上的差異, 為女性高於男性。不抽菸女性罹患肺癌的原因由先前研究得知, 主要和廚房烹調油煙與二手菸有關 (Ko et al., 2000; Anderson, et al., 2001)。烹調油煙的致癌物主要為 BaP、PAH 等, 與香菸的組成類似。但在暴露因子相同之下, 為何本研究中女性肺癌患者 hypermethylation 的比例較 LOH 高的多(42% hypermethylation, 10% LOH)? 有可能是主動抽菸中之致癌物含量遠高於被動暴露烹調油煙和二手菸。因此本研究抽菸男性患者之 p16 hypermethylation 與 LOH 的比例都相當高, 分別為 34% 和 42%, 此與其他研究所得到的結果相同。但台灣女性肺癌患者有特殊之環境致癌物暴露, 且暴露致癌物之含量較低或有不同的致癌物成份, 有可能形成 hypermethylation, 但還不致於造成 LOH。以

上假設還需進一步的研究。

有研究指出，暴露鈹、鉑等重金屬會造成氧化性的傷害，而與 ER、p16 基因的 hypermethylation 有相關性 (Belinsky et al., 2002 ; Govindarajan et al., 2002)。且由本實驗室先前的研究得知，油煙萃取物會造成 CL-3 細胞的 8-OH dG 氧化性傷害(Lin et al., 2002)，而此氧化性傷害是否與 hypermethylation 的生成有關？而女性廚房油煙暴露造成的 8-OH dG 氧化性傷害,是否也與 DNA hypermethylation 有關？此關聯性則需進一步由細胞實驗證明。

Shen (2002)等人發現慢性發炎及肝硬化之形成與 B、C 型肝炎病毒促進基因 hypermethylation 程度有關。主要發現甲基轉移酵素(DNA methyltransferase ; DNMT)在腫瘤組織 DNMT mRNA 的表現較正常組織高，導致腫瘤組織基因被 hypermethylation 的程度增加 (Robertson et al., 1999)。因此推測病毒感染可能參與 DNMT 基因的過表現，才造成肝炎和肝硬化之形成。因此本研究將進行 DNMT 基因的表現是否與 p16 基因 hypermethylation 之相關性研究，尤其是有 HPV 16/18 感染之台灣女性肺癌患者是否有上述之相關性，這些結果將有助於了解為何台灣女性肺癌有特高之 p16 hypermethylation 之機制。

本研究發現，同樣是不抽菸者，但不抽菸男性為何 hypermethylation 的比例僅為女性的一半( 21 % for nonsmoking male , 42 %

for nonsmoking female) , 但 LOH 的比例卻是女性的 3 倍 ( 30 % for nonsmoking male , 10 % for nonsmoking female)。我們推測可能是不抽菸女性烹調油煙暴露的程度比不抽菸男性高 , 且因 HPV16/18 的感染使得女性 hypermethylation 的比例高於男性。而不抽菸男性有可能因工作場所的職業暴露之機會較高 , 而導致 LOH 的比例高於女性。所以不抽菸男、女性產生 hypermethylation 與 LOH 的差異性 , 因此未來將由烹調油煙暴露的程度、HPV16/18 的感染及工作場所之職業暴露等方面來深入探討。

## 捌、參考文獻

- Ambinder, R. F., Robertson, K. D., Tao, Q. DNA methylation and the Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol.*, 9: 369~375, 1999.
- Anderson, K. E., Carmella, S. G., Ye, M., Bliss, R. L., Le, C., Murphy, L., Hecht, S. S. Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in nonsmoking women exposed to environmental tobacco smoke. *J. Natl Cancer Inst.*, 93: 378~381, 2001.
- Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M., Issa, J. P. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 72: 141~196, 1998.
- Belinsky, S. A., Snow, S. S., Nikula, K. J., Finch, G. L., Tellez, C. S., Palmisano, W. A. Aberrant CpG island methylation of the p16<sup>INK4a</sup> and estrogen receptor genes in rat lung tumors induced by particulate carcinogens. *Carcinogenesis*, 23: 335~339, 2002.
- Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Palmisano, W. A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S. B., Herman, J. G. Aberrant methylation of p16<sup>INK4a</sup> is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11891~11896, 1998.
- Betticher, D. C., Whit, G. R. M., Vonlanthen, S., Liu, X., Kappeler, A., Altermatt, H. J., Thatcher, N., Heighway, J. G1 control gene status is frequently altered in respectable non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 74: 556~562, 1997.
- Bird, A. The essential of DNA methylation. *Cell*, 70: 5~8, 1992.
- Brotherton, D. H., et al. Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19<sup>INK4d</sup>. *Nature*, 395: 244~250, 1998.
- Carins, P., Mao, L., Merlo, A., Lee, D. J., Schwab, D., Eby, Y., Tokino, K.,

- Van der Riet, P., Blaugrund, J. E., Sidransky, D. Rates of p16 (MST1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*, 265: 415~417, 1994.
- Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., White, R. L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanism in retinoblastoma. *Nature*, 305: 779~784, 1983.
- Chang, J. W. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in non-small cell lung cancer in Taiwan. *Master Thesis. Institute of Toxicology, Chung Shan Medical University, 2000.*
- Chen, C. J., Wu, H. Y., Chuang, Y. C., Chang, A. S., Luh, K. T., Chao, H. H., Chen, K. Y., Chen, S. G., Lai, G. M., Huang, H. H. et al. Epidemiological characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res.*, 10: 971~976, 1990.
- Chen, J. T., Chen Y. C., Wang, Y. C., Tseng, R. C., Chen, C. Y., Wang, Y. C. Alterations of the p16 gene in resected nonsmall cell lung tumors and exfoliated cells within sputum. *Int. J. Cancer*, 98, 724~731, 2002.
- Cheng, Y. W., Chiou, H. L., Sheu, G. T., Hsieh, L. L., Chen, J. T., Chen, C. Y., Su, J. M., Lee, H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res.*, 61: 2799~2803, 2001.
- Cooper, D. N., Krawczak, M. cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum. Genet.*, 83: 181~ 188, 1989.
- Diehl, J. A., Zindy, F., Sherr, C. J. Inhibition of cyclin D<sub>1</sub> phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, 11: 957~ 972, 1997.
- Doerfler, W., The insertion of foreign DNA into mammalian genomes and its consequence: a concept in oncogenesis. *Adv. Cancer Res.*,

66: 313~344, 1995.

Eguchi, K., Kanai, Y., Kobayashi, K., Hirohata, S. DNA hypermethylation at the D17S5 locus in non-small lung cancers: its association with smoking history. *Cancer Res.*, 57: 4913~4915, 1997.

Esteller, M., Herman, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J. Pathol.*, 196: 1~7, 2002.

Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., Herman, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 61: 3225~3229, 2001.

Feinberg, A. P. Methylation meets genomics. *Nat. Genet.*, 27: 9~10, 2001.

Free, A., Wakefield, Robert I. D., Smith, B. O., Dryden, David T. F., Barlow, P. N., Bird, A. P. DNA recognition by the methyl-CpG binding domain of MeCP2. *J. Biol. Chem.*, 276: 3353~3360, 2001.

Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C., Brambilla, E. Mechanism of p16<sup>INK4a</sup> inactivation in non-small cell lung cancers. *Oncogene*, 16: 497~504, 1998.

Greenlee, R. T., PhD, MPH; Hill-Harmon, M. B., MSPH; Murray, T., Thun, M., MD, MS. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.*, 51: 15~36, 2001.

Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Kyroudi, A., Veslemes, M., Rassidakis, A., Halazonetis, T. D., Field, J. K., Kittas, C. Alternation of the p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21~22 in non-small cell lung carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 153: 1749~1765, 1998.

Govindarajan, B., Klafter, R., Miller, M. S., Mansur, C., Mizesko, M., Bai, X. Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hyper-

methylation of p16(INK4a) and activation of MAP kinase. *Mol. Med.*, 1: 1~8, 2002.

Havrilesky, L. J., Alvarez, A. A., Whitaker, R. S., Marks, J. R., Berchuck, A. Loss of expression of the p16 tumor suppressor gene is more frequent in advanced ovarian cancers lacking p53 mutations. *Gynecol. Oncol.*, 83: 491~500, 2001.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9821~9826, 1996.

Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. R., Gnarr, JR., Linehan, W. M., Baylin, S. B. Silencing of the VHL tumor suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9700~9704, 1994.

Hui, R., Macmillan, R. D., Kenny, F. S., Musgrove, E. A., Blamey, R. W., Nicholson, R. I., Robertson, J. F. R., Sutherland, R. L. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: over-expression p16<sup>INK4a</sup> messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 6: 2777~2787, 2000.

Huschtscha, L. I., Reddel, R. R. p16<sup>INK4a</sup> and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis*, 20: 921~926, 1999.

Issa, J. P., Baylin, S. B., Belinsky, S. A. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res.*, 56: 3655~3658, 1996.

Jin, M., Inoue, S., Umemura, T., Moriya, J., Arakawa, M., Nagashima, K., Kato, H. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages 1 and 2. *Lung Cancer*, 34: 207~218, 2001.

Jones, P. A., Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian



- epigenetics. *Science*, 10: 1068-1070, 2001.
- Jones, P. A., Laird, P.W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, 21: 163~166, 1999.
- Juttermann, R., Li, E., Jaenisch, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11797~11801, 1994.
- Kashiwabara, K., Oyama, T., Sano, T., Fukuda, T., Nakajima, T. Relation between methylation status of the p16/CDK2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int. J. Cancer*, 79: 215~220, 1998.
- Kelly, M. J., Nakagawa, K., Steinberg, S. M., et al. Differential inactivation of protein in non-small cell lung cancer cell line. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 756~761, 1995.
- Khleif, S. N., Degregori, J., Yee, C. L., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Nevins, J. R., Howley, P. M. Inhibition of Cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4350 ~ 4354, 1996.
- Kim, D. H., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., Zheng, S., Christiani, D. C., Wain, J. C., Mark, E. J., Kelsey, K. T. p16<sup>INK4a</sup> and histology-specific methylation of CpG island by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 61: 3419~3424, 2001.
- Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, D., Ridder, R., Rudy, W., Petry, U., Dallenbach-Hellweg, G., Schmidt, D., Magnus von Knebel Doeberitz. Over-expression of p16<sup>INK4a</sup> as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int. J. Cancer*, 92: 276~284, 2001.
- Ko, Y. C., Lee, C. H., Chen, M. J., Huang, C. C., Chang, W. Y., Lin, H. J.,

- Wang, H. Z., Chang, P. Y. Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan. *Int. J. Epidemiol.*, 26: 24~31, 1997.
- Ko, Y. C., Cheng-Li, S. C., Lee, C. H., et al. Chinese food cooking and lung cancer in nonsmoking women. *Am. J. Epidemiol.*, 15: 140~147, 2000.
- Koo, L. C., Ho, J. H. C. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int. J. Epidemiol.*, 19: S14~S23, 1990.
- Kratzke, R. A., Greatens, T. M., Rubins, J. B., Maddaus, M. A., Niehans, G. A., Geradts, J. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res.*, 56: 3415~3420, 1996.
- Lee, C. H., Ko, Y. C., Goggins, W., Huang, J. J., Huang, M. S., Kao, E. L., Wang, H. Z. Lifetime environmental exposure to tobacco smoke and primary lung cancer of nonsmoking Taiwanese women. *Int. J. Epidemiol.*, 29: 224~231, 2000.
- Lee, C. H., Ko, Y. C., Cheng, L. S. C., Lin, Y. C., Lin, H. J., Huang, M. S., Huang, J. J., Kao, E. L., Wang, H. Z. The heterogeneity in risk factors of lung cancer and the difference of histologic distribution between genders in Taiwan. *Cancer Causes and Control*, 12: 289~300, 2001.
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366: 362~365, 1993.
- Liggett, W. H., Jr., Sidransky, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J. Clin. Oncol.*, 16: 1197~1206, 1998.
- Lin, S. Y., Tsai, S. J., Wang, L.H., Wu, M. F., Lee, H. Oxidative DNA damage induced by reactive oxygen species generated from cooking oil fumes in human lung adenocarcinoma CL-3 cells. *Nutr. Cancer*, 2002 (in press).
- Mead, L. J., Gillespie, M. T., Hung, J. Y., Rane, U. S., Rayeroux, K. C.,

- Irving, L. B., Campbell, L. J. Frequent loss of heterozygosity in early non-small cell lung cancers at chromosome 9p21 proximal to the CDKN2A gene. *Int. J. Cancer*, 71: 213~217, 1997.
- Merlo, A., Gabrielson, E., Askin, F., Sidransky, D. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 54: 640~642, 1994.
- Milde-Langosch, K., Riethdorf, S., Kraus-Poppinghaus, A., Loning, L. R. T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16<sup>MTS1</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, and p27<sup>KIP1</sup> in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch.*, 439: 55~61, 2001.
- Momparler, R. L., Bovenzi, V. DNA methylation and cancer. *J. Cell. Physiol.*, 183: 145~154, 2000.
- Nakamura, M., Sakaki, T., Hashimoto, H., Nakase, H., Ishida, E., Shimada, K., Konishi, N. Frequent alteration of the p14<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4a</sup> genes in primary central nervous system lymphomas. *Cancer Res.*, 61: 6335~6339, 2001.
- Nakayama, T., Kanedo, M., Kodama, M., Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature*, 314: 462~464, 1985.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., Carson, D. A. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368: 753~756, 1994.
- Omura-Minamisawa, M., Diccianni, M. B., Chang, R. C., Batova, A., Bridgeman, L. J., Schiff, J., Cohn, S. L., London, W. B., Yu, A. L. p16/p14<sup>ARF</sup> cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. *Clin. Cancer Res.*, 7: 3481~3490, 2001.
- Panning, B., Jaenisch, R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell*, 93: 305~308, 1998.

- Reed, A. L., Califano, J., Cairns, P., Westra, W. H., Jones, R. M., Koch, Wayne., Ahrendt, S., Eby, Y., Sewell, D., Nawroz, H., Bartek, J., Sidransky, D. High frequency of p16(CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.*, 56: 3630~3633, 1996.
- Robertson, K. D., Jones, P. A. DNA methylation : past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21: 461~467, 2000.
- Robertson, K. D. DNA methylation , methyltransferase, and cancer. *Oncogene*, 20: 3139~3155, 2001.
- Rocco, J. W., Sidransky, D. p16(MTS-1)/CDK2/INK4a in cancer progression. *Exp. Cell Res.*, 264: 42~55, 2001.
- Roussel, M. F. The INK4a family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, 18: 5311~5317, 1999.
- Ruas, M., Peters, G. The p16<sup>INK4a</sup>/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1378: F115~F177, 1998.
- Russo, A. A., et al. Structure basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumor suppressor p16<sup>INK4a</sup>. *Nature*, 395: 237~243, 1998.
- Sakai, T., et al. Allele- specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor suppressor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 880~888, 1991.
- Sanchez-Cespedes, M., Ahrendt, S. A., Piantadosi, S., Rosell, R., Monzo, M., Wu, L., Westra, W. H., Yang, S. C., Jen, J., Sidransky, D. Chromosomal alternations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmoker. *Cancer Res.*, 61: 1309~1313, 2001a.
- Sanchez-Cespedes, M., Decker, P. A., Doffek, K. M., Esteller, M., Westra, W. H., Alawi, E. A., Herman, J. G., Demeure, M. J., Sidransky, D., Ahrendt, S. A. Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers. *Cancer Res.*, 61: 2092~2096, 2001b.

- Sanchez-Cespedes, M., Reed, A. L., Buta, M., Wu, L., Westra, W. H., Herman, J. G., Yang, S. C., Jen, J., Sidransky, D. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 18: 5843~5849, 1999.
- Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., Nakajima, T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am. J. Pathol.*, 153: 1741~1748, 1998.
- Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., Moskaluk, C. A., Hahn, S. A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S. B., Kern, S. E., Herman, J. G. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.*, 57: 3121~ 3125, 1997.
- Serrano, M., Hannon, G. J., Beach, D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature*, 366: 704~707, 1993.
- Shapiro, G. I., Park, J. E., Edwards, C. D., Mao, L., Merlo, A., Sidransky, D., Ewen, M. E., Rollins, B. J. Multiple mechanism of p16<sup>INK4a</sup> inactivation in non-small lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 55: 6200~6209, 1995a.
- Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Kobzik, L., Godleski, J., Richards, W., Sugarbaker, D. J., Rollins, B. J. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.*, 55: 505~509, 1995b.
- Shen, L., Ahuja, N., Shen, Y., Habib, N. A., Toyota, M., Rashid, A., Issa, J-P, J. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94: 755~761, 2002.
- Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672~1677, 1996.

- Sherr, C. J., Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression. *Genes Dev.*, 13: 1501~1512, 1999.
- Smeds, J., Berggren, P., Ma, X., Xu, Z., Hemminki, K., Kumar, R. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the *CDKN2A*(*p16<sup>INK4a</sup>* and *p14<sup>ARF</sup>*) and *p53* genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis*, 23: 645~655, 2002.
- Song, S. H., Jong, H. S., Choi, H. >, Kang, S. H., Ryu, M. H., Kim, N. K., Kim, W. H., Bang, Y. J. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16<sup>INK4a</sup> expression in gastric adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 87: 236~240, 2000.
- Swafford, D. S., Middleton, S. K., Palmisano, W. A., Micheles, R., Nikula, K. J., Tesfaigzi, J., G., Baylin, S. B., Herman, J. G., Belinsky, S. A. Frequent aberrant methylation of p16<sup>INK4a</sup> in primary rat lung tumors. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 1366~1374, 1997.
- Taga, S., Osaki, T., Ohgami, A., Imoto, H., Yoshimatsu, T., Yoshino, I., Yano, K., Nakanishi, R., Ichiyoshi, Y., Yasumoto, K. Prognostic value of immunohistochemical detection of p16<sup>INK4a</sup> expression in non-small cell lung carcinomas. *Cancer*, 80: 389~395, 1997.
- Testa, J. R., Liu, Z., Feder, M., Bell, D. W., Balsara, B., Cheng, J. Q., Taguchi, T. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 95: 20~32, 1997.
- Tycko, B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J. Clin. Invest.*, 105: 401 ~ 407, 2000.
- Vertino, P. M., Yen, R. W. C., Gao, J., Baylin, S. B. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA(cytosine-5)-methyltransferase. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 4555 ~ 4565, 1996.

- Virmani, A. K., Fong, K. M., Kodagoda, D., McIntire, D., Hung, J., Tonk, V., Minna, J. D., Gazdar, A. F. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer*, 21: 308~319, 1998.
- Vonlanthen, S., Heighway, J., Tschan, M. P., Borner, M. M., Altermatt, H. J., Kappeler, A., Tobler, A., Fey, M. F., Thatcher, N., Yarbrough, W. G., Betticher, D. C. Expression of p16<sup>INK4a</sup>/p16<sup>â</sup> and p19<sup>ARF</sup>/p16<sup>â</sup> is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 over-expression. *Oncogene*, 17: 2779~2785, 1998.
- Wade, P. A. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays*, 23: 1131~1137, 2001.
- Yang, C. C., Jenq, S. N., Lee, H. Characterization of the carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazol[4,5-f]quinoxaline in cooking aerosols under domestic conditions. *Carcinogenesis*, 19: 359~363, 1998.
- Yang, C. C., Jenq, S. N., Kang, Z. C., Lee, H. Identification of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-N2-deoxyguanosine in human adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 1046~1050, 2000.
- Yu, K. Y. Gender difference in p53 gene mutations, p53, mdm2 protein expressions and mdm2 splicing transcripts in Taiwanese non-small cell lung cancer patients. *Master Thesis. Institute of Toxicology, Chung Shan Medical University, 2000.*
- Zhang, H. S., Postigo, A. A., Dean, D. C. Active transcriptional repression by the Rb-E<sub>2</sub>F complex mediates G<sub>1</sub> arrest triggered by p16<sup>INK4a</sup>, TGF beta, and contact inhibition. *Cell*, 97: 53~61, 1999.
- Zhu, W. G., Dai, Z., Ding, H., Srinivasan, K., Hall, J., Duan, W., Villalona-Calero, M. A., Plass, C., Otterson, G. A. Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine

in human lung cancer cells. *Oncogene*, 20: 7787~7796, 2001.

Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A. F., Minna, J. D. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Ann. Rev. Physiol.*, 64: 681~708, 2002.

Zochbauer-Muller, S., Fong, K. M., Virmani, A. K., Geradts, J., Gazdar, A. F., Minna, J. Aberrant promoter methylation of multiple gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.*, 61: 3581~3585, 2001.

Zur Hausan, H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl Cancer Inst.*, 92: 690~698, 2000.



## 玖、表與圖

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of lung cancer patients.**

<b>Characteristics</b>	<b>Number (n=143)</b>	<b>%</b>
<b>Age (yr ± SE)</b>	<b>63.8 ± 10.36</b>	
<b>66</b>	<b>74</b>	<b>51.7</b>
<b>&gt; 66</b>	<b>69</b>	<b>48.3</b>
<b>Gender</b>		
<b>Female</b>	<b>43</b>	<b>30.1</b>
<b>Male</b>	<b>100</b>	<b>69.9</b>
<b>Tumor stage</b>		
<b>1</b>	<b>51</b>	<b>35.7</b>
<b>2</b>	<b>38</b>	<b>26.6</b>
<b>3</b>	<b>54</b>	<b>37.7</b>
<b>Tumor type</b>		
<b>AD</b>	<b>80</b>	<b>55.9</b>
<b>SQ</b>	<b>63</b>	<b>44.1</b>
<b>T value</b>		
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>3.5</b>
<b>2</b>	<b>100</b>	<b>69.9</b>
<b>3</b>	<b>33</b>	<b>23.1</b>
<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3.5</b>
<b>N value</b>		
<b>0</b>	<b>64</b>	<b>44.7</b>
<b>1</b>	<b>27</b>	<b>18.9</b>
<b>2</b>	<b>50</b>	<b>40.0</b>
<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1.4</b>
<b>Smoking status</b>		
<b>Nonsmoking</b>	<b>81</b>	<b>56.6</b>
<b>Smoking</b>	<b>62</b>	<b>43.4</b>

**Table 2. Relationships between *p16* IHC and clinical parameters.**

Parameter	Number	p16 IHC (n=143)		p
		Negative (%)	Positive (%)	
<b>Age(years)</b>				
66	74	54(72.9)	20(26.1)	0.102
> 66	69	56(85.5)	13(14.5)	
<b>Gender</b>				
Female	43	31(72.1)	12(27.9)	0.369
Male	100	79(79.0)	21(21.0)	
<b>Tumor stage</b>				
1	52	39(75.0)	13(25.0)	0.680
2 &3	91	71(78.1)	20(21.9)	
<b>Tumor type</b>				
AD	80	60(75.0)	20(25.0)	0.102
SQ	63	50(79.4)	13(20.6)	
<b>T value</b>				
1 &2	105	81(77.1)	24(22.9)	0.917
3 &4	38	29(76.3)	9(23.7)	
<b>N value</b>				
0	64	48(75.0)	16(25.0)	0.623
1,2&3	79	62(78.5)	17(21.5)	
<b>Smoking status</b>				
Non-smoking	81	62(76.5)	19(23.5)	0.902
Smoking	62	48(77.4)	14(22.6)	
<b>p16 mRNA</b>				
Positive	9	3(33.3)	6(66.7)	0.001
Negative	71	59(83.1)	12(16.9)	

**Table 3. Relationships between *p16* promoter methylation and clinical parameters.**

Parameter	Number	p16 methylation (n=143)		p
		Negative (%)	Positive (%)	
<b>Age(years)</b>				
66	74	48(64.9)	26(35.1)	0.550
> 66	69	48(69.6)	21(30.4)	
<b>Gender</b>				
Female	43	25(58.1)	18(41.9)	0.133
Male	100	71(71.0)	29(29.0)	
<b>Tumor stage</b>				
1	52	39(75.0)	13(25.0)	0.130
2 &3	91	57(62.6)	34(37.4)	
<b>Tumor type</b>				
AD	80	56(70.0)	24(30.0)	0.411
SQ	63	40(63.5)	23(36.5)	
<b>T value</b>				
1 &2	105	69(65.7)	36(34.3)	0.548
3 &4	38	27(71.1)	11(28.9)	
<b>N value</b>				
0	64	49(76.6)	15(23.4)	0.031
1,2&3	79	47(59.5)	32(40.5)	
<b>Smoking status</b>				
Non-smoking	81	55(67.9)	26(32.1)	0.823
Smoking	62	41(66.1)	21(33.9)	
<b>p16 IHC</b>				
Positive	33	27(81.8)	6(18.2)	0.041
Negative	110	69(62.7)	41(37.3)	

**Table 3. (Continued)**

---

<b>p16 mRNA</b>				
<b>Positive</b>	<b>9</b>	<b>9(100)</b>	<b>0(0.00)</b>	<b>0.027</b>
<b>Negative</b>	<b>71</b>	<b>45(63.3)</b>	<b>26(36.7)</b>	

---

**Sixty-three cases were not determined in p16 mRNA analysis. p16 mRNA was examined by RT-PCR experiment.**

**Table 4. Relationships between LOH at *p16* locus and clinical parameters.**

Parameter	Number	p16 LOH (n=138)		p
		Negative (%)	Positive (%)	
<b>Age(years)</b>				
66	74	54(73.9)	19(26.1)	0.417
> 66	65	44(67.7)	21(32.3)	
<b>Gender</b>				
Female	41	37(90.2)	4(9.80)	0.001
Male	97	61(62.9)	36(37.1)	
<b>Tumor stage</b>				
1	48	34(70.8)	14(29.2)	0.973
2 &3	90	64(71.1)	26(28.9)	
<b>Tumor type</b>				
AD	78	63(80.7)	15(19.3)	0.004
SQ	60	35(58.3)	25(41.7)	
<b>T value</b>				
1 &2	101	76(75.2)	25(24.8)	0.070
3 &4	37	22(59.5)	15(40.5)	
<b>N value</b>				
0	60	39(65.0)	21(35.0)	0.172
1,2&3	78	59(75.6)	19(24.4)	
<b>Smoking status</b>				
Non-smoking	78	63(80.7)	15(19.3)	0.004
Smoking	60	35(58.3)	25(41.7)	
<b>p16 IHC</b>				
Positive	32	23(71.9)	9(28.1)	0.903
Negative	106	75(70.8)	31(29.2)	

Five cases were not determined in the LOH experiment.

**Table 5. *p16* inactivation by promoter methylation and LOH among NSCLC patients stratified by gender and smoking status.**

Parameters	Non-smoking		Smoking	p
	Female	Male	Male	
<b>Methylation</b>				<b>0.135</b>
Positive	18(42%)	8(21%)	21(34%)	
Negative	25(58%)	30(79%)	41(66%)	
p	<b>0.045</b>		<b>0.170</b>	
<b>LOH</b>				<b>0.002</b>
Positive	4(10%)	11(30%)	25(42%)	
Negative	37(90%)	26(70%)	35(58%)	
p	<b>0.025</b>		<b>0.237</b>	

**Table 6. The correlation between *p16* IHC expression and promoter methylation and LOH among NSCLC patients stratified by gender and smoking status.**

Parameter	IHC (n=143)						p
	Nonsmoking				Smoking		
	Female		Male		Male		
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	
Methylation							
Positive	2	16(52%)	1	7(23%)	3	18(38%)	
Negative	10	15	6	24	11	30	
p		<b>0.029</b>			<b>0.330</b>		<b>0.069</b>
LOH							
Positive	1	3(10%)	1	10(33%)	7	18(39%)	
Negative	10	27	6	20	7	28	
p		<b>0.097</b>			<b>0.420</b>		<b>0.018</b>

**Table 7. Relationship between HPV16 or HPV18 DNA detection and p16 expression.**

	<b>HPV16 or HPV18 DNA(n=143)</b>		<b>p</b>
	<b>Negative(%) (n=68)</b>	<b>Positive(%) (n=75)</b>	
<b>P16 IHC</b>			<b>0.002</b>
<b>Positive</b>	<b>8(24.3)</b>	<b>25(75.7)</b>	
<b>Negative</b>	<b>60(54.6)</b>	<b>50(45.4)</b>	



**Table 8. Literature reviews of p16 IHC detection in NSCLC patients.**

Population	USA	Japan	UK	Japan	USA	France	ROC	USA	Japan	Present study
Patient no.	18/48	57/106	27/51	84/115	14/38	19/35	58/115	36/70	28/82	33/143
Positive (%)	38	54	53	73	37	54	50	51	34	23
Antibody		Pharmingen		Santa cruz	DCS-50		Santa cruz		JC-8	Santa cruz
		G175-405		C20			C20	F-12	C20	F-12
Male		32/63		54/78			49/97	34/67		21/100
Positive (%)		51		69			51	51		21
Female		25/43		30/37			10/18	2/3		12/43
Positive (%)		58		81			56	67		28
AD	1/6	38/72		51/64	6/19	12/19	29/56	17/32	19/35	20/80
Positive (%)	17	53		80	32	63	52	53	54	25
SQ	17/42	19/34		26/43	8/19	7/16	26/51	14/30	8/41	13/63
Positive (%)	40	56		60	42	44	51	47	20	21
Smoker							29/62	26/54		14/62
Positive (%)							47	48		23
Nonsmoker							18/33	8/13		19/81
Positive (%)							54	62		24
Ref.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

Ref:

1. Kratzke et al., 1996.
2. Jin et al., 2001.
3. Betticher et al., 1997.
4. Taga et al., 1997.
5. Sanchez-Cespedes et al., 1999.
6. Gazzeri et al., 1998.
7. Chen et al., 2002.
8. Gorgoulis et al., 1998.
9. Kashiwabara et al., 1998.

**Table 9. Literature reviews of promoter methylation detection in NSCLC patients.**

Population	USA	USA	UK	France	ROC	USA	Japan	Present study
Patient no.	51/185	12/47	27/107	5/35	38/67	18/70	10/29	47/143
Positive (%)	28	26	25	14	57	26	34	33
Male	32/101		23/76		34/58	18/67	9/23	29/100
Positive (%)	32		30		58	27	39	29
Female	19/84		4/31		4/9	0/3	1/6	18/43
Positive (%)	23		13		44	0	17	42
AD	21/94		6/45	2/19	14/26	7/32	3/11	24/80
Positive (%)	22		13	11	54	22	27	30
SQ	24/59		16/43	3/16	21/35	11/30	6/16	23/63
Positive (%)	41		37	19	60	37	38	37
Smoker	28/75	7/33	27/98		29/43			21/62
Positive (%)	37	21	28		67			34
Nonsmoker	2/13	5/14	0/9		7/16			26/81
Positive (%)	15	36	0		44			32
Ref.	1	2	3	4	5	6	7	

Ref:

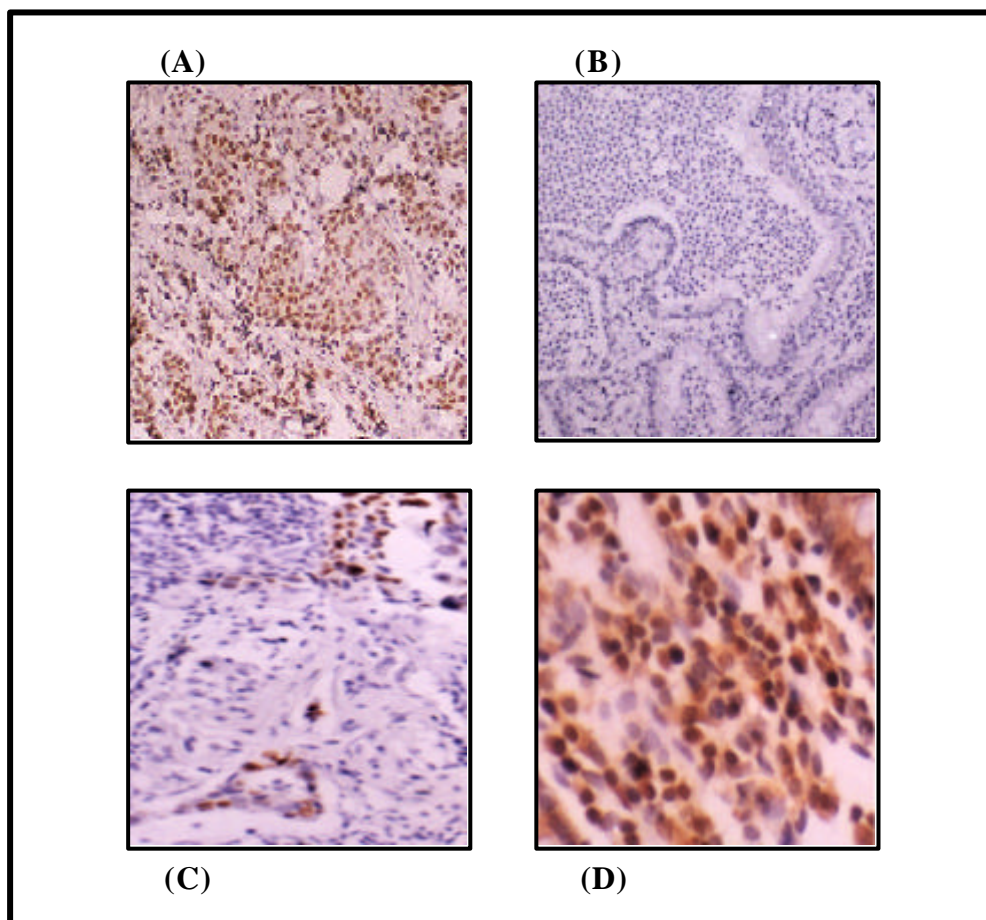
1. Kim et al., 2001
2. Sanchez-Cespedes et al., 2001b.
3. Zochbauer-Muller et al., 2001b.
4. Gazzeri et al., 1998.
5. Chen et al., 2002.
6. Gorgoulis et al., 1998.
7. Kashiwabara et al., 1998.

**Table 10. Literature reviews of LOH detection in NSCLC patients.**

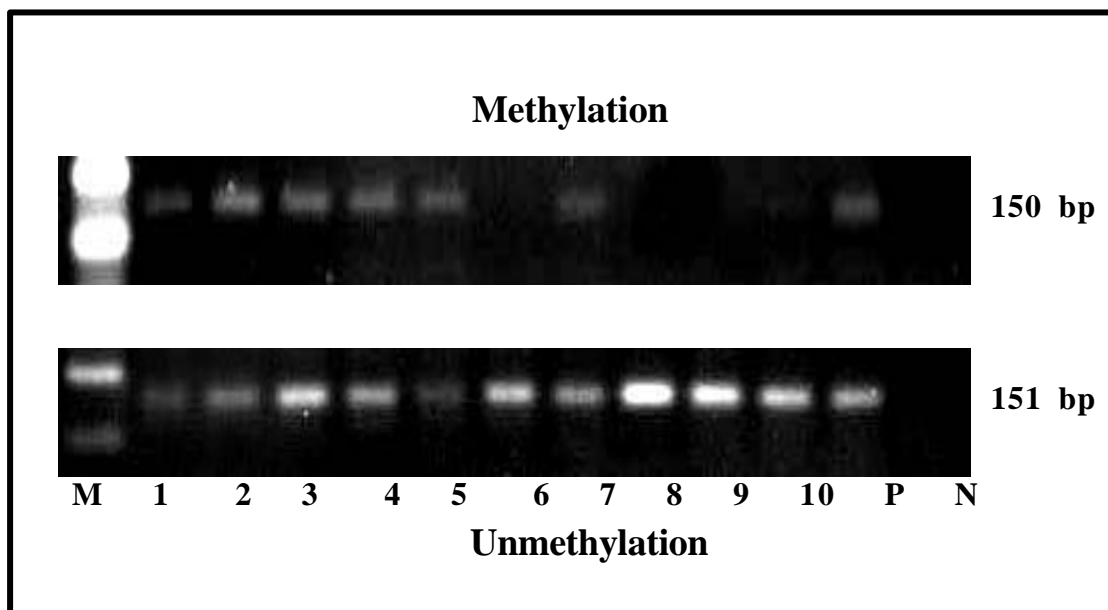
Population	USA	USA	USA	ROC	USA	Present study
Patient no.	27/47	21/44	28/38	15/51	22/36	40/138
Positive (%)	57	48	74	29	61	29
Male				14/42		36/97
Positive (%)				33		37
Female				1/9		4/41
Positive (%)				11		10
AD		21/44		8/27	12/19	15/78
Positive (%)		48		30	63	19
SQ				7/23	10/15	25/60
Positive (%)				30	67	42
Smoker	23/33	17/26		8/24		25/60
Positive (%)	70	65		33		42
Nonsmoker	4/14	4/18		5/17		15/78
Positive (%)	28	22		29		19
Ref.	1	2	3	4	5	

Ref:

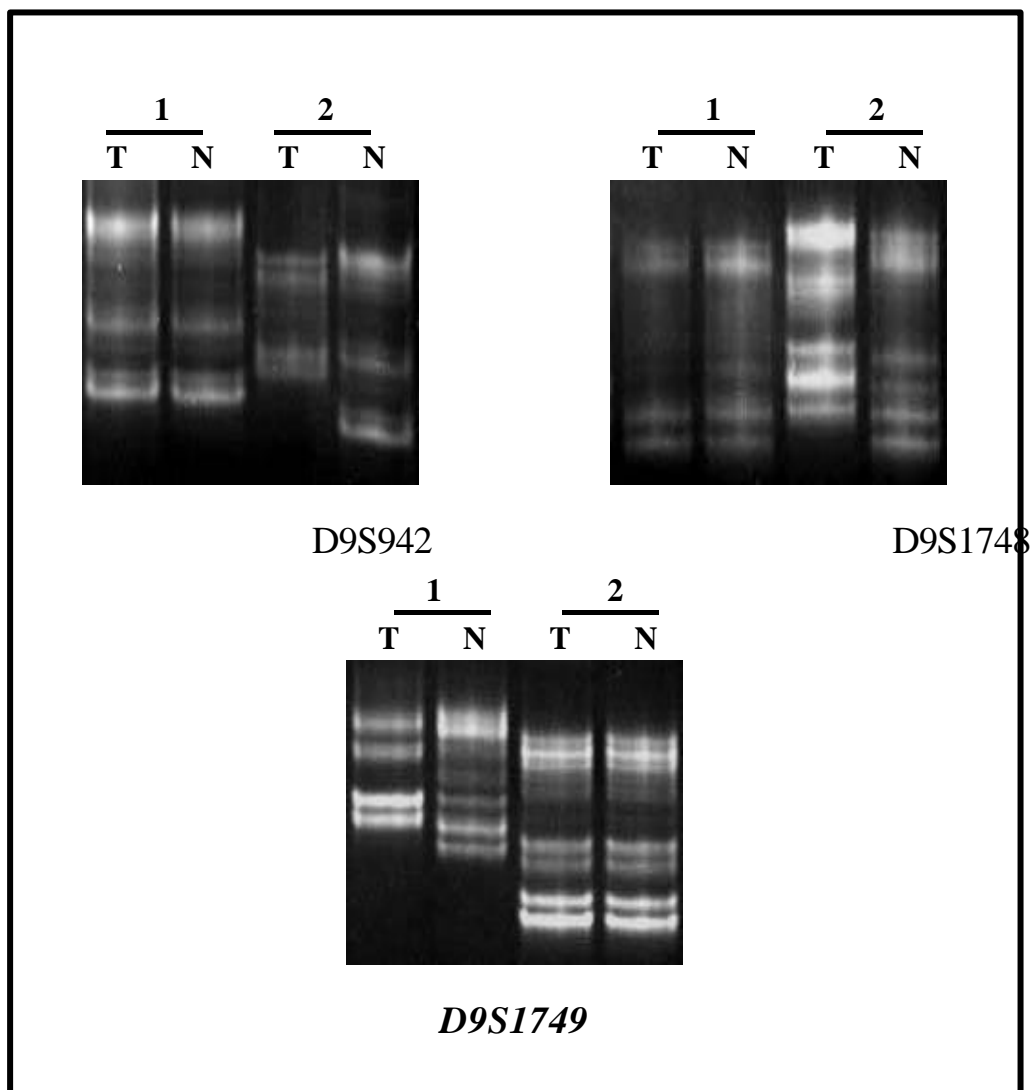
1. Sanchez-Cespedes et al., 2001b.
2. Sanchez-Cespedes et al., 2001a.
3. Sanchez-Cespedes et al., 1999.
4. Chen et al., 2002.
5. Merlo et al., 1994.



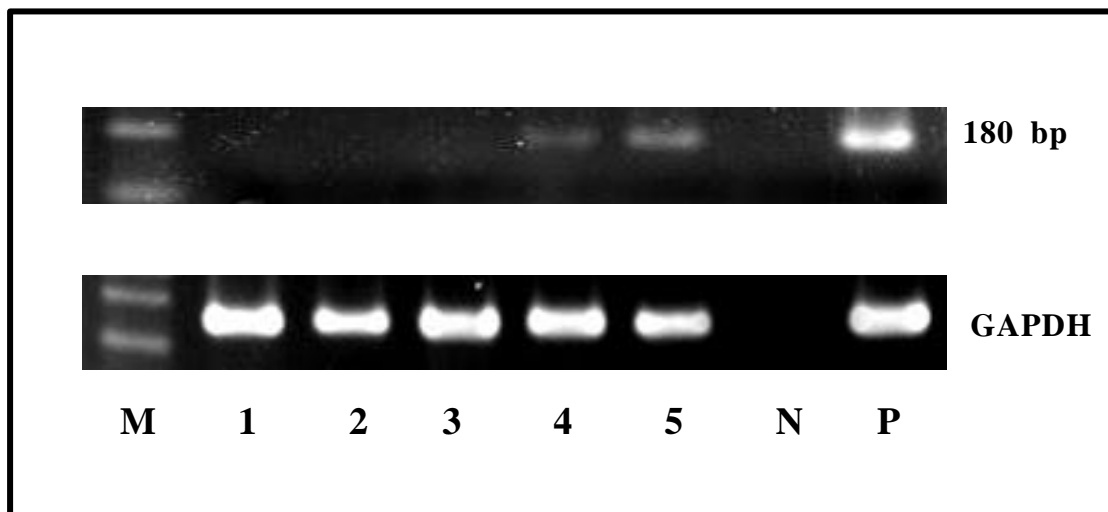
**Fig 1. Representative of p16 immunohistochemistry analysis in lung tumors. (A) Lung tumor cells showing positive nuclear staining for the high expression of p16 protein and (B) Negative immunostaining of p16 protein expression (C) Low expression of p16 protein ( X100 original magnification ). (D) positive control ( X200 original magnification ).**



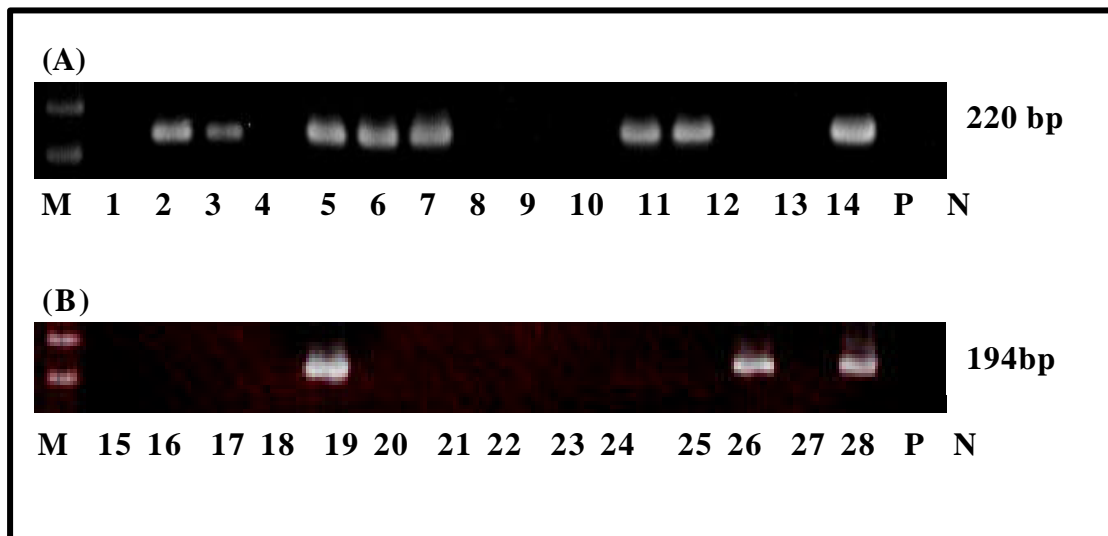
**Fig 2. Examples of *p16* promoter methylation. M: marker; Line 1 10: lung cancer patients; N: negative control. Calu-1 DNA was used as positive control for *p16-M* PCR and non-cancer normal DNA was used as positive control for *p16-U* PCR.**



**Fig 3. Representative examples of microsatellite analysis at chromosome 9p21. Case numbers are shown at the top, and microsatellite marker numbers are identified at the bottom. N, normal; T, tumor**

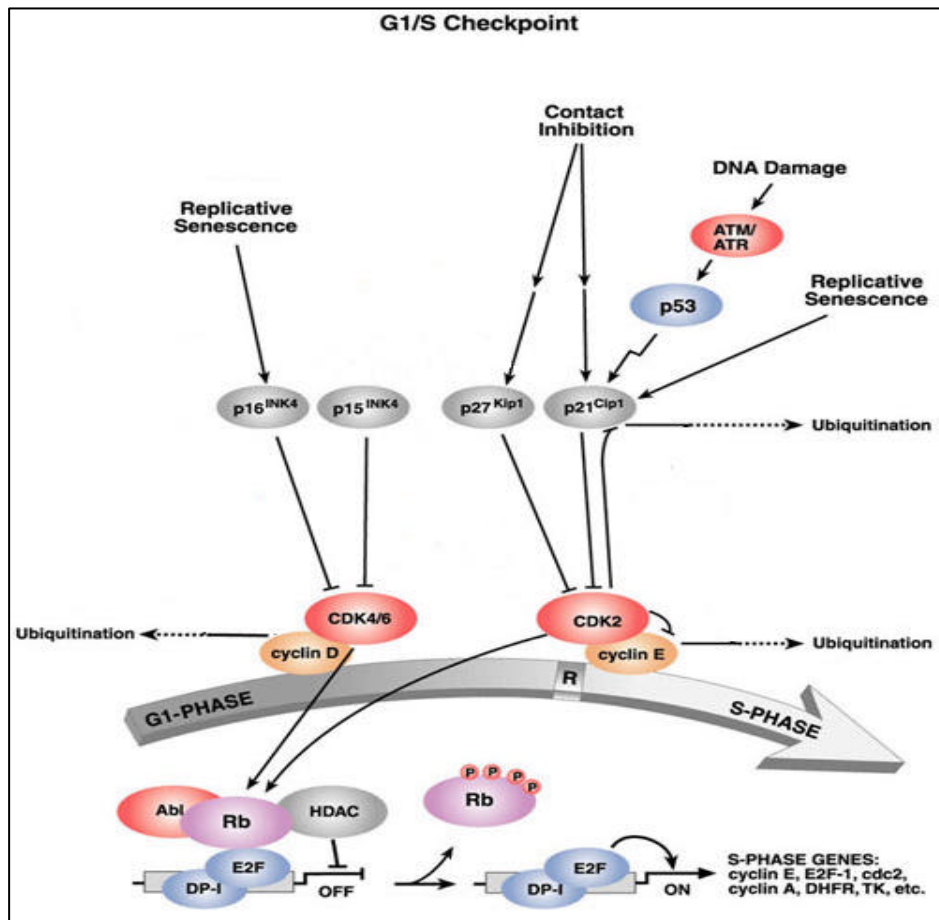


**Fig 4. Detection of *p16* mRNA expression in lung tissues from NSCLC by RT-PCR and GAPDH mRNA expression as internal control. M: marker; Line 1 5 :lung cancer patients; P: positive control (HeLa cell line); N: negative control.**

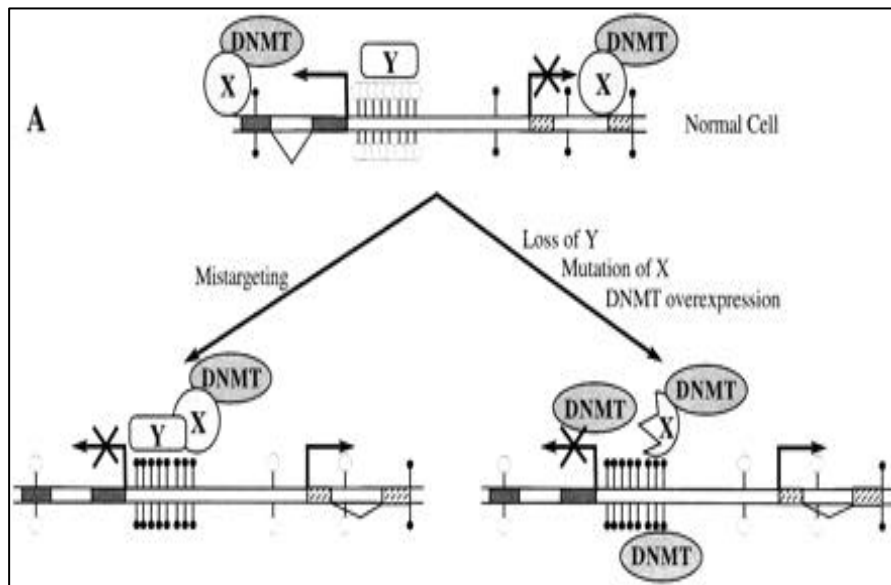


**Fig 5. Representatives of positive and negative results of nested PCR for the detection of HPV16(A) and HPV18(B). DNA in lung tumors of lung cancer patients (Lane 1-28). Lane M : 100bp ladder DNA marker. Lane P: positive control, which was DNA of SiHa, HeLa cell lines served as positive control for HPV16, 18 respectively. N: negative control, in which the DNA template was replaced with distilled water.**





**Fig 6.** The G1/S cell cycle checkpoint controls the passage of eukaryotic cells from the first “gap” phase (G1) into the DNA synthesis phase (S). Two cell cycle kinases, CDK4/6-cyclin D and CDK2-cyclin E, and the transcription complex that includes Rb and E2F are pivotal in controlling this checkpoint.



**Fig 7. Schematic diagram showing interaction of various DNMTs with other cellular proteins may target methylation to proper regions (shown by interaction with hypothetical protein X) and protect CpG islands from *de novo* methylation (shown by hypothetical protein Y blocking access of the DNMT to DNA).**

**(Robertson et al., 2000)**

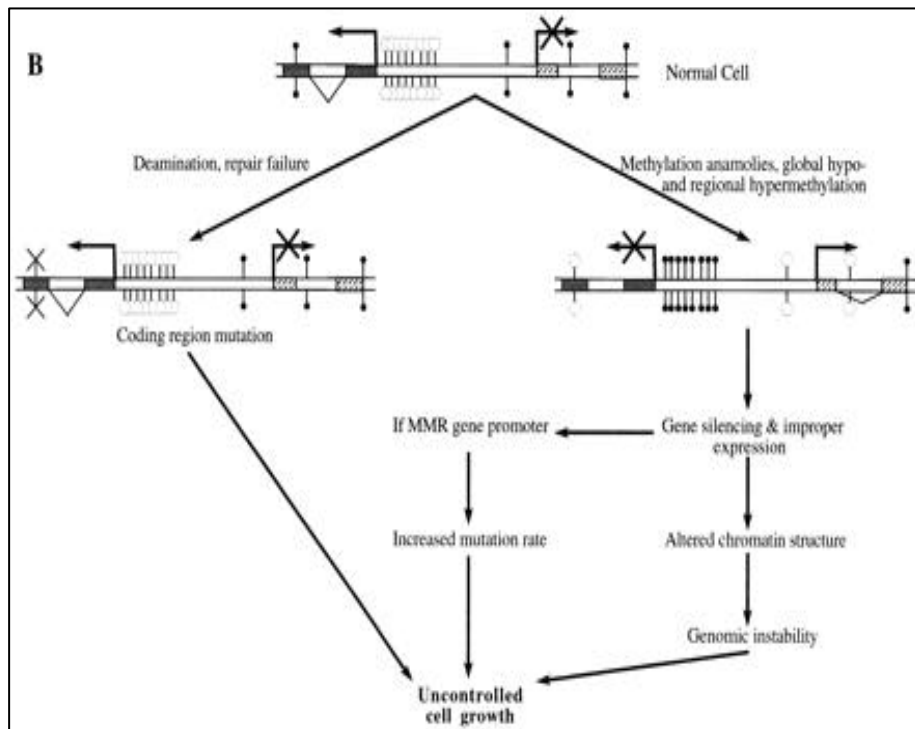


Fig 8. Mechanisms by which CpG methylation may contribute to tumorigenesis.

(Robertson et al., 2000)

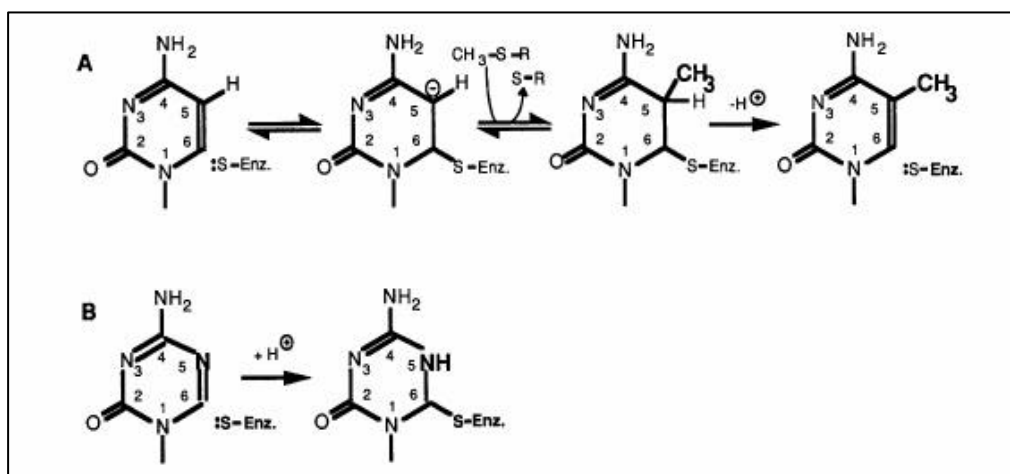


Fig 9. (A) Reaction mechanism of cytosine MTase. It was shown for bacterial DNA cytosine-5-methyltransferases that a covalent intermediate formed between cytosine within the DNA and the enzyme during the catalytic reaction. (B) Proposed reaction mechanism when 2'-deoxycytidine is replaced by the analog 5-aza-2'-deoxycytidine. The MTase is trapped in an inactivating intermediate.

(Juttermann et al., 1994)

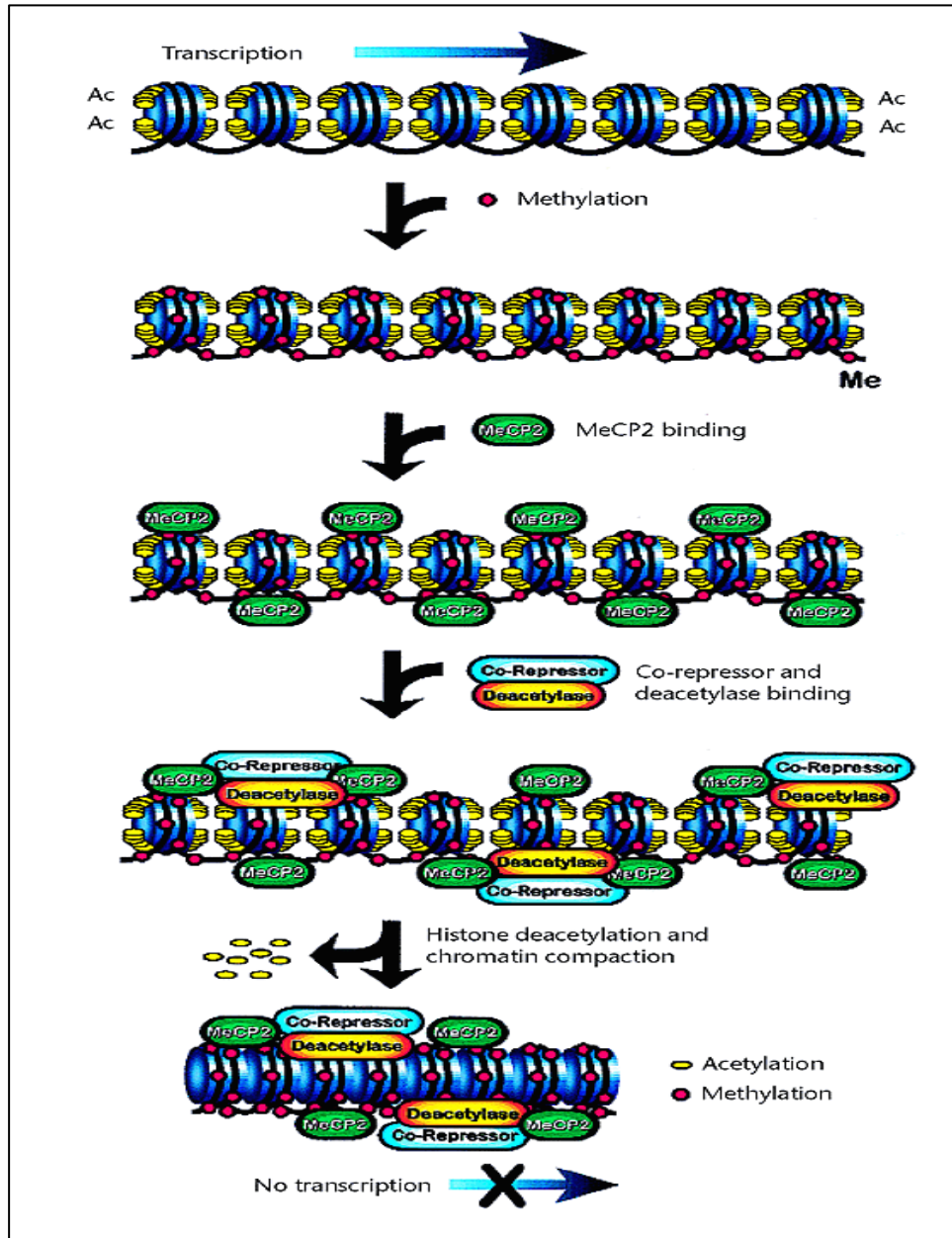
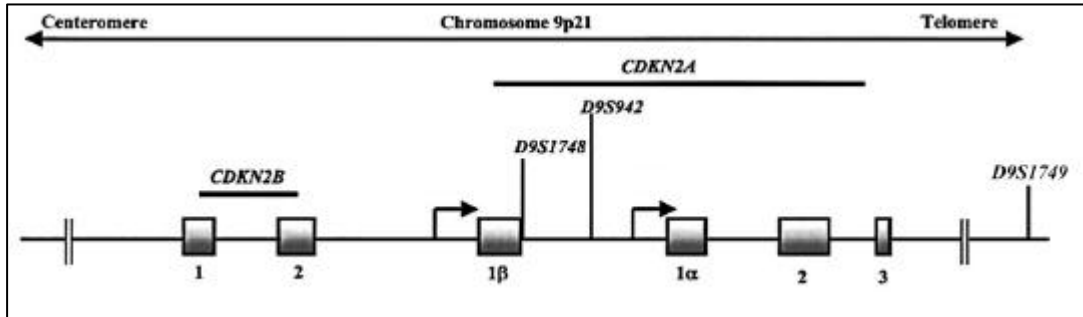


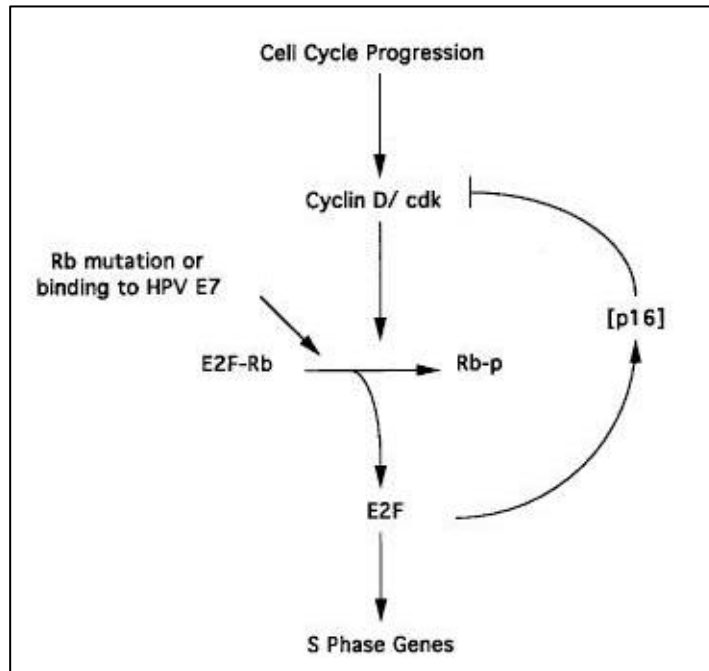
Fig 10. Mechanism of transcriptional repression by DNA methylation. The structure of transcriptionally active chromatin is shown schematically at the top. Nucleosomes are shown as blue cylinders representing the core histone complexes with DNA indicated by the black line wrapped around the cylinders. Yellow ovals (Ac) denote acetylation of histones. DNA methylation (Me) is indicated by red circles.

(Jones et al., 1999)



**Fig 11. Genomic organisation of the *CDKN2A* and *CDKN2B* genes on 9p21.** The *CDKN2A* gene from partially shared sequence encodes two cell regulators p16 and ARF, which are transcribed from separate promoters located at 5' side of unique exons 1 $\alpha$  and 1 $\beta$ . Two microsatellite markers *D9S942* and *D9S1748* are located between exon 1 $\alpha$  and 1 $\beta$ .

(Smeds et al., 2002)



**Fig 12. A proposed model suggesting the regulation of a p16-related CKI activity by the level of active RB. When there is functional loss of RB by either mutation of the gene or as a consequence of binding to viral oncoprotein(HPV E7 or SV40 Tag), the RB-E2F complex will be disrupted resulting in an increase in the level of free E2F. This will in turn increase the level of the [p16] activity either by the loss of inhibitory effect or RB-E2F complex or by the transcriptional activating effect of E2F.**

(Khleif et al., 1996)

## 拾、英文摘要：

Lung cancer is the leading cause of cancer death in Taiwanese women. However, less than 10% of Taiwanese women are smokers, the development of female lung cancer could not be solely explained by smoking habit. Moreover, low frequencies of p53 and k-ras mutations were observed in Taiwanese nonsmoking female lung cancer. Thus, we hypothesize that involvement of p16<sup>INK4a</sup> inactivation in lung tumorigenesis may be various between gender. In this study, 143 NSCLC tumors, including 62 smoking and 81 nonsmoking, were collected to examine p16 inactivation at the levels of protein, chromosome, promoter region, and mRNA by immunohistochemistry, methylation-specific PCR, LOH, and RT-PCR, respectively. As shown in previous studies, smoking lung tumors had higher frequencies of p16 LOH than those of nonsmoking lung tumors (70% for smoker vs. 28% for nonsmoker,  $P = 0.02$ ). We also found that LOH at p16 locus were significantly correlated with patients' parameters of smoking status, tumor type and gender ( $P = 0.004$  for smoking status,  $P = 0.004$  for tumor type, and  $P = 0.001$  for gender). After being stratified by gender and smoking status for three group of smoking male, nonsmoking male and female, there was a significant difference between nonsmoking female and male ( $P=0.029$ ) in p16 promoter hypermethylation, but no difference between smoking and nonsmoking male cases ( $P = 0.330$ ). Moreover, p16 inactivation in 52% of nonsmoking female and 23% of nonsmoking male cases may be explained by promoter hypermethylation. In LOH analysis, a marginal difference was found between nonsmoking male and female cases (10% for nonsmoking female vs. 33% for nonsmoking male,  $P = 0.097$ ). In conclusion, p16 inactivation in more than a half of nonsmoking female lung cancer was mediated by promoter methylation, not by LOH. However, p16 inactivation in nonsmoking male lung cancer was mainly through LOH, just like as previous studies in smoking male lung cancer. Thus, gender difference in p16 inactivation mechanisms was revealed in lung tumorigenesis in Taiwan. As shown in previous studies, the occurrence of p16 hypermethylation was related with special carcinogen exposure and virus infection. Thus, we suggested that female lung cancer patients with high frequent of p16 inactivation induced by p16 hypermethylation maybe correlate with special environment exposure and



virus infection. These results showed that the promoter hypermethylation in p16 inactivation may play a critical role in lung tumorigenesis among nonsmoking female lung cancer in Taiwan.

