

1. 中文摘要

自民國七十一年開始，肺癌一直是台灣女性和男性癌症的第一和第二大死亡原因。已知抽菸是導致肺癌的最重要原因，歐美國家的肺癌有 90% 以上可用抽菸來解釋。但是台灣地區則有一半的肺癌無法以抽菸來解釋，尤其台灣女性肺癌患者有 90% 以上是不抽菸者。因此可能有其他的環境因子參與不抽菸者肺癌的形成。而本研究所探討之環境因子包括環境致癌物之暴露和微生物的感染。

已知香菸中的多環芳香烴致癌物-benzo[a]pyrene (BaP) 會經過體內酵素代謝產生具高度活性的中間代謝物，然後攻擊 DNA 形成 DNA 鍵結物，造成抑癌或致癌基因的突變，終致腫瘤形成。因此首先了解肺癌患者的肺組織中 DNA 鍵結物含量，是否較非癌症患者高？以確定 DNA 鍵結物是否可做為肺癌之危險生物因子？因此收集 73 位肺癌和 33 位非癌症患者之腫瘤周圍或非病灶的正常肺組織，以 ^{32}P -postlabeling 分析 DNA 鍵結物之含量，結果發現肺癌患者 DNA 鍵結物之含量 (49.58 ± 33.39 adducts/ 10^8 nucleotides) 顯著高於非癌症患者 (18.00 ± 15.33 adducts/ 10^8 nucleotides, $P < 0.001$)。又發現抽菸和不抽菸之肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量並無差異 (抽菸者: 49.03 ± 37.21 , 非抽菸者: 49.28 ± 30.73 ; $P = 0.719$)。而 DNA 鍵結物含量和患者本身之 CYP1A1 和 GSTM1 的基因多形性無關，但和 CYP1A1 的蛋白表現有關。這些結果顯示環境致癌物暴露所造成之肺組織 DNA 鍵結物形成之貢獻度可能不低於抽菸。由多變項統計分析的結果顯示，參與肺癌之危險因子中，以肺組織 DNA 鍵結物含量高於 48.66 adducts/ 10^8 nucleotides 者罹患肺癌之危險性是低者的 25.19 倍為最高 ($P = 0.003$)，另外僅有年齡因子達到統計意義，其餘因子如性別、抽菸習慣、CYP1A1 和 GSTM1 的基因多形性都無法做為肺癌之危險因

子。

過去研究大多認為女性對抽菸之感受性較高，為了了解不抽菸之婦女是否對環境致癌物之感受性也較高？因此各收集 30 位不抽菸之男、女性肺癌患者以及 20 位不抽菸之非癌症患者之肺組織，以 ^{32}P -postlabeling 和 ELISA 兩種方法分析 DNA 鍵結物含量，以了解不抽菸之肺癌和非癌症患者間，是否同樣是肺癌患者對環境暴露有較高之感受性？並了解不抽菸之男、女性對環境致癌物暴露是否有不同之感受性？結果發現確實肺癌患者對環境暴露有較高之感受性。同時亦發現女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物顯著高於不抽菸男性。且其 DNA 鍵結物之差異並非是 CYP1A1 和 GST-M1 基因多形性及蛋白表現不同所致，這結果顯示女性對環境致癌物暴露有較高之感受性。因此台灣婦女有較高之肺癌死亡率或許是由於他們對環境致癌物之感受性較高有關。

由於台灣女性肺癌患者有較高之 DNA 鍵結物含量，因此推測可能有較高之 p53 和 K-ras 突變頻率。但本研究室的初步結果卻發現 52 位不抽菸女性肺癌患者中僅有兩位有 p53 基因突變，其突變率僅有 3.9%，而沒有任何一個女性肺癌患者有 k-ras 基因突變。在免疫組織化學分析的結果發現，肺腫瘤組織中的 p53 及 Rb 蛋白又大部分不表現，且 p53 及 Rb 之調控基因如 MDM2、p16 及 cyclinD1 之蛋白表現又無法完全解釋 p53 及 Rb 蛋白的去活化。因此推測有其他外來之生物因子參與了肺癌的形成。

人類乳突瘤病毒 (human papillomavirus 16/18 ; HPV 16/18) 所轉譯出來的 E6 及 E7 致癌蛋白，具有去活化 p53 及 Rb 蛋白的能力。因此大膽假設 HPV 可能參與肺腫瘤組織中 p53 及 Rb 的去活化作用。本實驗收集了 141 位肺癌和 60 位非癌症患者，以巢疊式 PCR (nested PCR) 分析 HPV 16/18 兩種高危險型和 HPV 6/11 兩種低危險型之 HPV，以了解肺癌和非癌症患者之感染率

是否不同？結果發現四種 HPV 在肺癌患者的感染率分別為 35.5%, 41.1% , 28.4% 和 10.0% , 其中 HPV 6, 16, 18 的感染率在肺癌和非癌症患者間具有統計上之差異。因此 HPV 16, HPV 18 和 HPV 6 三種 HPV 的感染可能和肺癌形成有關。若比較抽菸和性別時, 則發現不抽菸之女性肺癌患者 HPV 16/18 的感染率竟高達 60% 和 73% , 其感染率遠高於男性肺癌患者 (HPV 16: 24%, HPV 18: 26%)。而 HPV 6 的感染率卻以抽菸男性最高, 達到 38.1% , 但不抽菸女性的 HPV 6 的感染率最低, 僅有 11.1%。這結果顯示不同性別和抽菸習慣之肺癌可能有不同型之 HPV 參與。因此 HPV 16/18 感染可能與不抽菸的台灣婦女肺癌形成有關。同時也發現 HPV 6 及 16 之 DNA 感染與腫瘤期別有關, 第一期之肺癌患者有最高之 HPV 6 和 HPV 16 感染率, 因此 HPV 可能參與肺癌早期之形成。

已知 HPV 16/18 的 E6/E7 蛋白參與 p53 和 Rb 蛋白的去活化, 因此本研究進一步以 *in situ* RT-PCR 分析 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 在肺腫瘤組織的表現, 以了解是否參與 p53 和 Rb 蛋白的去活化而造成肺腫瘤形成。結果發現在兩張連續病理切片中, 肺腫瘤組織中有 E6/E7 mRNA 表現的, 有 80% 測不到 p53 和 Rb 蛋白的表現, 且 HPV 16 E6/E7 表現 p53/Rb 去活化之肺癌患者之預後也明顯較差。因此 HPV 16/18 可能透過 E6/E7 致癌蛋白去活化 p53 和 Rb 蛋白之致癌路徑參與肺癌形成。總之, 有較高的環境致癌物暴露而形成的 DNA 傷害, 同時又有較高之 HPV 16/18 的感染, 可能是不抽菸之台灣婦女為何有較高之肺癌死亡率的原因。

2. 文獻綜論

2.1. 吸菸與肺癌形成之相關性

2.1.1. 流行病學研究

近三十年來台灣與歐美國家一樣，肺癌死亡率都有逐年顯著增加的現象。在二次世界大戰前，肺癌在台灣是非常罕見之癌症。例如 1900 年至 1945 年間，3,153 病例病理解剖報告中，僅有 12 例被證實為肺癌。直至 1951 年開始以支氣管鏡病理切片診斷肺癌之臨床病例，因而肺癌病例逐年增加。目前肺癌已成為台灣民眾癌症死亡的重要死亡原因。

根據行政院衛生署統計資料顯示，自 1982 年以來，惡性腫瘤就高居台灣民眾十大死因之首，而肺癌則分別位居男、女性之第二位和第一位之癌症死因。1982 年台灣男性與女性每十萬人中，就有 16.69 及 7.78 人是因肺癌而死亡，到了 2000 年，每十萬人之男性與女性，分別有 38.69 及 17.52 人是因肺癌而死亡 (Department of Health, ROC, 1984 - 2000)。近年來，女性肺癌死亡率增加的幅度顯著高於男性 (Fig. 1)。因此台灣女性肺癌之病因學研究是值得研究之課題。

已知抽菸是造成肺癌的主要致病原因。大約 80% 的肺癌可用抽菸解釋。許多流行病學的研究都發現，香菸和肺癌形成有顯著的劑量效應關係。抽菸者罹患肺癌的危險性是不抽菸者的十倍，而重度抽菸者罹患肺癌之危險性，更可達到 15 到 25 倍之多 (Public Health Service, USA, 1982)。罹患肺癌之危險性，會隨著抽菸的年數、每天抽菸量、吸菸深度及焦油含量的增加而增高 (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1986)，因此大

多數的研究都證實，抽菸是肺癌致病的主要原因。以下將就抽菸導致肺癌之主要機轉做一敘述，以做為探討不抽菸者罹患肺癌可能機轉之基礎。

2.1.2. DNA 鍵結物與肺癌形成

Benzo(a)pyrene (BaP) 是香菸中主要的致癌物，屬於多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)。Hall et al. (1990) 研究指出多環芳香烴在生物體內，會經由微粒體單氧化酵素系統或前列腺素 H 合成酵素 (prostaglandin H synthase ; PHS) 代謝活化成 epoxide，然後經水合作用轉變為 diols 型的活化最終代謝物，而與 DNA 共價結合形成 DNA 鍵結物。DNA 鍵結物已被認為是造成基因突變，而引起癌症發生的主要化學致癌機轉的基礎 (Dipple et al., 1987)。例如香菸中典型之人類可能致癌物- BaP 的代謝活化過程，主要是經由 cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) 酵素系統代謝活化生成(±)-trans-7,8-dihydroxy-9,10 -dihydrobenzo(a)pyrene，然後再繼續氧化成最終代謝產物 anti-7,8-dihydroxy-9,10 -epoxy- 7,8,9,10 tetrahydrobenzo (a)pyrene (BPDE)，此活化代謝產物會直接攻擊 DNA dG 之 N2 位置形成 DNA 鍵結物 (Jeffrey et al., 1976; 1977)。另一個主要代謝路徑是單電子氧化 BaP 產生 radical cation，此產物會攻擊 DNA 的 dG 之 N7 位置，而形成 BPDE-N7-dG 鍵結物 (Cavalieri and Rogan, 1992)。這些代謝路徑和形成之 DNA 鍵結物都在細胞及動物實驗得到證實。例如人類白血球經處理 100 μ M BaP，在外加酵素活化下，可產生 1.3 BaP-adducts/ 10^8 nucleotides (Roggeband et al., 1993)。Wolterbeek 等 (1993) 以導管直接將 BaP 灌入倉鼠的氣管中，結果發現倉鼠氣管會形成 BaP 的主要 DNA 鍵結物- BPDE-N2-dG (Wolterbeek et al., 1993; Roggeband et al., 1994)。這些 DNA 鍵結物常會導致鹼基配對錯誤而造成基因突變。最近研究發現香菸中之主要致癌物 BaP 會造成 p53 codon 157、158、248、249 及 273 位置發生 G T

的鹼基更換突變 (base substitution mutation)。而 K-ras codon 12、13 及 61 的突變亦發現與 BPDE-N2-dG 鍵結物有關 (Hussain et al., 2001 ;Husgafvel-Pursiainen et al., 1993; Rodenhuis et al., 1988; Slebos et al., 1991; Westra et al., 1993)。因此香菸中 BaP 致癌物所造成之 BPDE-N2-dG 會引起 p53 和 K-ras 基因突變，是已知由抽菸引起肺癌的主要分子化學致癌機轉。

有關肺癌與 DNA 傷害之研究，大多分析肺癌患者非腫瘤組織中之 DNA 鍵結物含量，以獲知 DNA 鍵結物與肺癌形成是否相關？茲將過去所發表有關肺癌之 DNA 鍵結物之研究數據整理於 Table 1。Phillips et al. (1988) 首次發現肺癌患者之每天抽菸量與其肺組織中多環芳香烴-DNA (PAH-DNA) 鍵結物的含量呈線性的正相關性。後來 Randerath et al. (1989) 也有相同的發現。Xie et al. (1998) 發現抽菸者之 DNA 鍵結物含量明顯高於不抽菸者 (抽菸者：276.2 adducts/ 10^8 nucleotides；不抽菸者：114.2/ 10^8 nucleotides)。Wiencke et al. (1995) 發現肺癌患者之血液單核球和肺組織中的 DNA 鍵結物含量有相關性。因此分析血球之 DNA 鍵結物含量，進行病例-對照組之研究，結果發現肺癌患者對香煙之易感性顯著高於健康者。van Schocket et al. (1998) 發現香菸所造成的 DNA 鍵結物，在肺組織中的半生期約為 1.7 年。因此認為抽菸會累積高量之 DNA 鍵結物於肺組織。由以上研究結果得知，抽菸是肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物形成的主要貢獻源。但是有些報告卻顯示，DNA 鍵結物的含量與每日吸菸量並沒有相關性 (van Schooten et al., 1990; Geneste et al., 1991; Ryberg et al., 1994; Spivack et al., 1997)。且 DNA 鍵結物的含量與吸菸年數竟呈相反的關係 (Ryberg et al., 1994)，即抽菸愈久者其肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物的含量反而越少。荷蘭學者在肺癌患者肺組織中含有 19 420 BPDE-N2-dG adducts/ 10^8 nucleotides，此 DNA 鍵結物之含量與抽菸量之間並沒有相關性。但發現抽有濾嘴香菸之肺癌患者的 PAH-DNA 鍵結物含量顯著較抽沒有濾嘴之香菸之患者低 (van Schooten

et al., 1990)。這些完全相反結果發現，有可能是受測者開始抽菸的年紀不同所致。例如 Wienke et al. (1999) 發現肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量與抽菸的年齡有關。若開始抽菸的年齡愈小，抽菸引起之 DNA 鍵結物的感受性就越高。

除了抽菸外，環境污染物之暴露可能也會參與肺組織中 DNA 鍵結物之形成。Lewtas et al. (1997) 指出暴露高量空氣污染物時，其白血球形成 PAH-DNA 鍵結物之含量，反而與暴露量無關，因此推測暴露高量污染物時，代謝活化酵素可能被用盡或是 DNA 修補酵素和解毒酵素被誘發所致。目前之研究大多比較肺癌患者及非癌症之控制組淋巴球中之 DNA 鍵結物含量，或僅分析肺癌患者非腫瘤組織中之 DNA 鍵結物含量，以評估 DNA 鍵結物與肺癌形成之相關性。而肺癌患者與非癌症之控制組之目標器官 - 肺臟中 DNA 鍵結物含量是否不同？大多還是不清楚。就我們所知，目前僅有三篇文獻是直接分析肺癌患者及非癌症控制組肺組織中 DNA 鍵結物含量，來評估 DNA 鍵結物與肺癌之相關性，但所得結果並不一致。Bartsch et al. (1995) 分析癌症患者及非癌症之控制組肺組織中 DNA 鍵結物含量，結果發現在抽菸之肺癌患者肺組織中 CYP1A1 蛋白表現量及 DNA 鍵結物含量較不抽菸之非癌症控制組高，且 DNA 鍵結物含量高低與 Aryl hydrocarbon hydroxylase 的活性有關，但肺癌患者及非癌症控制組之間的 DNA 鍵結物含量則沒有差異。van Schoket et al. (1998) 利用 ^{32}P -postlabeling 方法分析 124 位肺癌患者及 26 位非癌症控制組之肺組織中 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 及 GSTM1 基因多形性之間的相關性，結果發現 DNA 鍵結物含量在肺癌患者及非癌症控制組中並無差異，但抽菸者其肺組織中的 DNA 鍵結物含量則明顯高於不抽菸者。又發現 GSTM1 不表現型之抽菸者，罹患鱗狀上皮細胞癌之危險性較高。Xie et al. (1998) 的研究指出，男性肺癌患者及非癌症控制組肺組織中的 DNA 鍵結物含量沒有差異。但抽

菸者肺組織中的 DNA 鍵結物含量則顯著的高於不抽菸者。但在女性肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物含量卻高於非癌症之控制組，且女性抽菸者肺組織中的 DNA 鍵結物含量顯著的高於女性不抽菸者。同時又發現女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物的形成與廚房油煙之暴露有關，因此推測肺組織中的 DNA 鍵結物含量，可用來做為暴露環境污染物之生物指標。作者又發現 DNA 鍵結物的含量與腫瘤形式、細胞分化程度和淋巴結轉移有關。在鱗狀上皮細胞癌患者之肺組織中，DNA 鍵結物含量高於肺腺癌患者；分化程度較差之患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量高於分化程度較好者；淋巴結轉移之患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量則高於沒有淋巴結轉移者。由以上結果得知，抽菸、性別、代謝解毒酵素的活性及基因型、污染物之暴露、性別、腫瘤形式、細胞分化程度和淋巴結轉移等因子皆與 DNA 鍵結物的形成有關。本研究為了了解 DNA 傷害程度和台灣肺癌形成之相關性，首先釐清肺癌患者是否有較非癌症者有較高之 DNA 鍵結物的形成，以了解肺癌患者與非癌症控制組對環境及香菸暴露所造成的 DNA 傷害，是否具有不同之易感性。然後再釐清抽菸是否是肺組織中 DNA 鍵結物形成的主要貢獻者？因此比較抽菸及不抽菸之肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量，以獲知環境致癌物暴露對肺組織中 DNA 鍵結物形成的貢獻度。

2.1.3. 代謝解毒基因與 DNA 鍵結物

環境與基因交互作用對腫瘤形成具有重要影響。癌症大多會有嗜電子活化物與 DNA 形成鍵結物，引起致癌基因活化、抑癌基因失去活性或是造成染色體不穩定等致癌機轉，而導致腫瘤形成。人類參與代謝致癌物之基因主要區分為兩部分，Phase I 酵素是將致癌物或致突變物活化成 epoxides 或活性氧 (reactive oxygen) 的形式，而使致癌物或致突變物更容易與 DNA

結合形成鍵結物，例如細胞色素 P450 (cytochrome P450) 系列基因。Phase II 酵素則是將致癌物或致突變物，代謝成較不具親電性或較具水溶性之代謝產物，以加速有毒化合物之代謝，如：麩胺硫轉移酵素 (Glutathione S-transferase)。而本節將著重於與多環芳香烴之代謝以及與肺癌形成較具相關之細胞色素 P450 1A1 (cytochrome P450 1A1, CYP1A1) 及麩胺硫轉移酵素 M1 (Glutathione S-transferase M1, GSTM1) 做一整理。

2.1.3.1. CYP1A1 基因多形性和蛋白表現

CYP1A1 屬於 Phase I 之代謝活化酵素，是細胞代謝 BaP 的主要酵素，經 CYP1A1 代謝後之 BaP 將會與 DNA 鍵結形成 DNA 鍵結物，而造成細胞的基因表現異常或甚至轉形癌化。CYP1A1 主要是透過 AhR (aryl hydrocarbon receptor) 路徑所調控。細胞質中的 AhR 原本與熱休克蛋白 90 (heat shock protein 90 ; hsp90) 結合，當 BaP 進入細胞內會與 AhR 結合，造成 hsp90 與 AhR 分開，此時被活化之配位體-AhR 結合物，會通過核膜進入細胞核內，並與核內蛋白 Arnt 結合，形成 AhR-Arnt 複合物，然後與 CYP1A1 基因促進轉錄之區域 (enhancer region)- xenobiotic responsive element (XRE) DNA 序列結合，而促進錄活化 CYP1A1 基因的表現 (Fig. 2; Whitlock et al., 1996)。

CYP1A1 的酵素活性可能與基因多形性有關，CYP1A1 共有三個具有基因多形性的位置：第一個位置主要在 3' 端 noncoding region 發生 T → C transition, 稱為 CYP1A1*2A；第二及第三個位置則主要是在 exon 7 發生 A → G transition 稱為 CYP1A1*2B 及 CYP1A1*2C，而 CYP1A1 基因的多形性會影響酵素的活性。過去在日本、韓國及夏威夷等黃種人的研究都發現，CYP1A1 基因的多形性可能與肺癌患者罹患肺癌之易感性有關 (Kawajiri et

al., 1990; Hayashi et al., 1991; Nakachi et al., 1991 ; Xu et al., 1996; Hong et al., 1998; Le marchand et al., 1998) , 但在白種人的研究上卻沒有這種相關性 (Tefre et al., 1991; Hirvonen et al., 1992) 。 Table 2 整理最近五年有關 CYP1A1 基因多形性與肺癌之研究，大多研究顯示 CYP1A1 基因多形性與肺癌形成之易感性有關，且會影響 DNA 鍵結物的形成 (Graeme et al., 2001; Chen et al., 2001) 。 台灣肺癌患者之研究發現，肺癌患者及非癌症控制組之間 CYP1A1 基因型的頻率並無差異，但若區分腫瘤細胞形式時，就發現 CYP1A1 基因型和鱗狀上皮細胞癌之發生有關 (Lin et al., 2000) 。 因此本研究將對肺癌患者之基因多形性與非癌症控制組做一比較，並進一步了解基因多形性與 DNA 鍵結物含量之相關性，以了解 CYP1A1 基因型和 DNA 鍵結物形成是否有關？

2.1.3.2. GST M1 基因多形性和其蛋白表現

GST M1 是屬於 Phase II 之代謝酵素，參與 BaP 的代謝解毒路徑，已知 GSTM1 的酵素活性亦受到基因多形性的影響。GST M1 的基因多形性主要由於整個基因座缺失而使其失去活性，因此分成非無效型 (wild type) 及無效型 (null type) 兩種 (Seidegard et al., 1988) 。 許多研究都證實 GSTM1 之基因型與肺癌形成之易感性有關。例如抽菸者 GSTM1 之基因型若為無效型，罹患肺癌之危險性較 GSTM1 基因型為非無效型者高 (Seidegard et al., 1986, 1990 ; Hirvonen et al., 1993 ; Nakachi et al., 1993 ; McWilliams et al., 1995 ; Chen et al., 2001) 。 又發現 GSTM1 無效型之解毒能力較差，且發生姊妹染色體交換之頻率較高 (van Poppel et al., 1992) ， DNA 鍵結物之形成量亦較高 (Seidegard et al., 1986, 1990 ; Hirvonen et al., 1993 ; Nakachi et al., 1993 ; Shield et al., 1993 ; McWilliams et al., 1995 ; Chen et al., 2001; Godschalk et al., 2001 ; Reszka et al., 2001) 。 Ryberg et al. (1994) 分析 135 位肺癌患者

及 342 位非癌症控制組 GSTM1 之基因多形性，結果發現 GSTM1 無效型者罹患肺癌之危險性較高。Chen et al. (2001) 發現 GSTM1 基因型為無效型者 (null) 不論其 CYP1A1 之基因型為 Ile/Val 或 Val/Val 罹患肺癌的危險性都比 GSTM1 基因型為非無效型者 (positive) 高，若抽菸超過 30 年以上，GSTM1 基因型為無效型者罹患肺癌的危險性比一般人高 3.47 倍。William et al. (1999) 發現不抽菸之女性有二手菸暴露者，GSTM1 之基因型為無效型者罹患肺癌的危險性為 GSTM1 positive 者的 2.6 倍。這些結果均顯示 GSTM1 基因型為無效型者對抽菸和環境暴露均有較高之罹患肺癌的危險。Nakachi et al. (1993) 的研究結果發現，抽菸者 CYP1A1 基因型為 Ile-Val 且 GSTM1 為無效型者，罹患肺癌的危險性是正常人的 16.1 倍。除了基因型之外，GST M1 的蛋白表現亦會影響肺癌形成的危險性，GST M1 蛋白不表現者罹患肺癌之危險性為表現者之 2.12 倍 (Houlston et al., 1999)。因此本研究將比較肺癌患者之 GST M1 之基因多形性與 DNA 含量間的相關性，以了解 GSTM1 代謝解毒基因，對肺癌患者 DNA 鍵結物形成是否有關？

2.1.4. p53 和 K-ras 基因突變

DNA 鍵結物常會造成鹼基在配對時發生錯誤導致基因突變，當致癌基因或抑癌基因發生突變，經常是導致細胞癌化而引起腫瘤發生的重要原因。以下將就與肺癌形成較有關之 p53 及 K-ras 作進一步之介紹。

2.1.4.1. p53 基因

p53 基因是一個已知的抑癌基因，當 DNA 受到傷害時 p53 基因會被活化，使細胞週期停留在 G1 期，以便進行 DNA 之修復作用；但當 DNA 傷

害過大而無法修復時，p53 便會促使細胞走向凋亡 (apoptosis)。在腫瘤的形成過程中，p53 抑癌基因是最常發生基因突變或蛋白表現異常的基因 (Greenblatt et al., 1994)。由過去的研究結果得知，約有 73% 的小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 及 45% 的非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者有 p53 基因突變 (Greenblatt et al., 1994; Harris et al., 1996; Velculescu et al., 1996)。而其中有 80-90% 的 p53 突變可用抽菸來解釋。在歐美國家，小細胞肺癌患者 p53 基因發生突變率為 70%，而非小細胞肺癌則較低，其中鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma) 有 65% 的突變率，大細胞癌 (large cell carcinoma) 有 60% 的突變率，肺腺癌 (adenocarcinoma) 則有 33% 的突變頻率 (Greenblatt et al., 1994; Harris et al., 1996; Velculescu et al., 1996)。在 NSCLC 患者中，大細胞癌及鱗狀上皮細胞癌的突變形式類似，大多為 G T 誤意突變，約佔 43-49%，但此類型的 p53 突變在肺腺癌並不常見。

由流行病學的研究結果顯示，抽菸與肺癌形成具有密切的關係。香菸中主要的致癌成份之一 - BaP 會攻擊 DNA 形成鍵結物，而造成 p53 基因 G:C T:A 的突變。另外香菸含有 N-nitrosamine-4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone 亦會攻擊 DNA 形成 DNA 鍵結物，造成 p53 基因 G:C T:A 的突變 (Greenblatt et al., 1994)。BaP-DNA 鍵結物造成之 G T 誤意突變，最常發生在 p53 基因的 codons 157, 158, 248, 249 及 273，這與 NO 或 UV 所造成的 p53 基因突變的位置或形式不同 (NO: codon 249; UV: CC TT) (Hussain et al., 2001)。聯合國國際癌症組織於 2000 年四月公佈的統計資料顯示，1598 位抽菸者之 p53 突變以 G T 及 G A 為主，分別佔 29% 及 28%。而在 99 位不吸菸者 p53 突變則以 G A 為主，佔所有突變形式的 50% (Fig. 4) (Hussain et al., 2001)。Wang et al. (1998) 以 SSCP 和 DNA 直接定序分析 61 位肺癌患者肺腫瘤組織中 p53 基因的突

變頻率，結果發現僅有 11 位發生 p53 突變且都是在鱗狀上皮肺癌，其突變頻率僅有 18%，相對低於其他國家之 p53 突變頻率 (Table 3)。又發現 p53 的突變形式主要為缺失突變，達到 64% (7/11) 之多。過去大多數的研究都發現鱗狀上皮肺癌的 p53 突變形式，是以 G->T 誤意突變為主，但台灣鱗狀上皮肺癌之 p53 基因突變卻有如此高的缺失突變。因此推測引起台灣肺癌 p53 基因突變之致癌物可能有抽菸以外之引起結構移位的環境致癌物的參與。本研究室過去對 163 位非小細胞肺癌患者肺組織中 p53 基因的突變情形進行分析，包括 51 位女性及 112 位男性，其中包括 72 位抽菸者及 40 位不抽菸者，而女性肺癌患者全為不抽菸者，僅有 19 位患者被發現有 p53 基因突變，突變頻率僅有 11.6%，此頻率遠低於過去文獻所發表之研究結果 (Table 4)。在性別因子上，這 19 位發生突變的患者中，僅有兩位是女性。在 51 位女性肺癌患者之突變頻率僅有 3.9%，而在 112 位分析的男性患者之 p53 突變頻率則有 15.2%。男性患者之突變頻率大約是女性的四倍，在統計上有顯著之差異 (P = 0.038)。同時發現 p53 突變頻率與腫瘤期別有統計上之相關性，即愈晚期之肺癌患者，p53 突變頻率則愈高 (第一期 6.3%；第二期 4.0%；第三期 18.7%；P = 0.035；Table 4)。因此 p53 基因突變可能沒有參與台灣肺癌形成的起始期 (initiation stage)。由女性肺癌患者之 p53 基因突變頻率顯著偏低的結果，又暗示 p53 基因層次發生突變，可能並非引起女性肺癌形成的主要機轉。

p53 基因之突變形式及臨床資料列於 Table 5。在這 19 位發生 p53 基因突變的患者中，有 6 位的突變位置在 p53 基因 exon 7 的位置，佔 32% (6/19)，其次為 exon 6 佔 21% (4/19)，而在 exon 4、5、8 則各有 3 位佔 16% (3/19)。在五個分析之 exon 中，以 exon 7 發生突變之頻率最高。而在突變形式上，有 7 位屬於 deletion mutation 佔 36.8%；屬於 transversion mutation 的有 10 位佔了 52.6%，其中有 3 位患者為 G T，2 位患者為 G C，2 位患者為 T

G 及 2 位 T → A 形式突變的患者。另外 2 位屬於 transition mutation (10.5% ; 2/19) , 一位為 C → A , 另一位為 A → G。與抽菸有關之 G → T 僅有 3 位佔 15.8%。由 p53 基因突變形式來看, 僅有不到兩成的 p53 突變與抽菸中 BaP 的致癌物暴露有關, 因此暴露抽菸以外之環境致癌物, 可能參與台灣肺癌患者 p53 基因的突變。

2.1.4.2. K-ras 基因

ras 家族包括三種基因: c-H-ras (H-ras), c-ki-ras-2 (K-ras) 及 N-ras。這三種蛋白均有 GTPase 的活性, 且都具有與細胞膜結合及訊息傳遞的功能, N-ras 基因突變主要發生在黑色素瘤及血液有關的惡性瘤。H-ras 基因突變已在許多部位的腫瘤中發現, 但以泌尿道部分的腫瘤為主 (Bos et al., 1989)。而 K-ras 基因突變則主要與大腸直腸癌及肺癌形成有關 (Mills et al., 1995)。K-ras 是一個已知的致癌基因, 一般基因突變經常會造成蛋白去活化, 但 K-ras 基因突變卻會增加其活性, 過去研究指出許多腫瘤, 均發現有 K-ras 的突變, 如: 胰臟癌、直腸癌及肺癌等, 其主要的突變位置都發生在 codon 12、codon 13 及 codon 61, 其中又以 codon 12 為最主要約佔 90%。在肺癌的研究中發現, 肺腺癌患者 K-ras 約有 15-60% 的突變頻率 (Table 4) (Capella et al., 1991; Husgafvel-Pursiainen et al., 1993; Mills et al., 1995; Vainio et al., 1993), 但在鱗狀上皮細胞癌中 K-ras 突變頻率卻相當的低。又有些研究指出 K-ras 突變與抽菸習慣有關。即抽菸之肺腺癌患者 K-ras 突變頻率較不抽菸者為高 (Husgafvel-Pursiainen et al., 1993; Rodenhuis et al., 1988; Slebos et al., 1991; Vainio et al., 1994; Westra et al., 1993)。在不同的腫瘤形式 K-ras 基因的突變頻率也不同, 約有 30% 的肺腺癌可測到 K-ras 基因 codon 12 G → T 的突變, 但在鱗狀上皮細胞癌 K-ras 之突變頻率則偏低 (Rodenhuis et al., 1988), 且 K-ras 突變也會影響患者之預後, K-ras 突變

者三年及五年存活率均較 K-ras 不突變者低。 Slebos et al. (1989) 發現 19 位 K-ras 突變的肺癌患者只有 7 位的存活率超過三年，但在沒有 K-ras 突變的 50 位肺癌患者，存活率超過三年的則有 34 位。但 Graziano et al. (1999) 分析 260 位第一期及第二期之肺癌患者 K-ras 基因突變與其存活率之間的相關性，結果發現不論在第一期或第二期肺癌患者之存活率與 K-ras 基因突變均無相關，且在 93 肺腺癌患者中有 27 位的 K-ras 基因發生突變 (29%)，但在 61 位鱗狀上皮細胞癌中卻只有一位患者發生突變 (1.6%)，在 39 位大細胞癌中有五位患者發生突變 (12.8%)。這些結果均顯示，K-ras 基因突變可能與腫瘤形式有關。因此 K-ras 可能參與了吸菸之肺腺癌患者之肺癌的形成。

2.2. 致癌基因與肺癌

2.2.1. p53 蛋白的去活化

在許多腫瘤的形成過程中，p53 抑癌基因是最常發生基因突變或蛋白表現異常的基因 (Greeblatt et al., 1994)。目前已知會造成 p53 蛋白失去功能的原因有下列幾種原因：一是 p53 基因發生突變，一是 p53 蛋白去活化。在前節已討論過 p53 基因突變與肺癌形成之間的相關性；因此本節將就蛋白層次說明 p53 蛋白去活化對肺癌形成的影響。已知有些病毒類或非病毒類的蛋白與 p53 結合，會造成 p53 蛋白失去功能，例如：70 kDa heat shock protein Mdm2、SV40 病毒的 large T 細胞抗原、adenovirus 2 及 5 的 E1b 蛋白及 HPV 病毒的 E6 oncoprotein 等，這些蛋白是透過與 p53 蛋白結合，使其失去調控細胞週期的功能，或是透過 ubiquitin proteasomal pathway 將 p53 蛋白水解，進而影響 p53 調控細胞週期的功能 (Scheffner et al., 1990; Talis et al., 1998)。以下將就部分病毒類或非病毒類的蛋白與 p53 之間的交

互作用做進一步之說明：

p53 是致癌基因 MDM2 (murine double minute 2)的轉錄因子具有促進 MDM2 基因表現的能力，兩者間具有負回饋控制的作用。當 DNA 受到傷害時，會促使 p53 蛋白的表現量增加，而此時 p53 會與 MDM2 的轉錄起始區結合起始 MDM2 的轉錄作用 (Maltzman et al., 1984; Kastan et al., 1991; Lu et al., 1993)。而當 MDM2 蛋白表現增加則會透過 ubiquitin-proteasome 調控路徑分解 p53。Ubiquitin proteasome pathway 在真核生物中是以非溶小體 (Non-lysosome) 方式進行蛋白水解，過程中包含有三種酵素的使用：E1 (ubiquitin activated enzyme)、E2 (ubiquitin conjugated enzyme)、E3 (ubiquitin ligase) (Ciechanover et al., 1994; Hochstrasser et al., 1995; Jentsch et al., 1995; Smith et al., 1996)。首先在 ATP 存在下，ubiquitin 經由 E1 的活化後與 E1 用 thioester 鍵結形成 E1-ubiquitin 複合物，接著將活化的 ubiquitin 以相同高能量的 thioester 鍵，轉送往 E2，再經由 E3 作用，將活化的 Glycine 位置與受質蛋白的 Lysine 位置鍵結，使 ubiquitin 標定在受質蛋白上，而進一步被蛋白水解酵素 (26S proteasome) 水解成較小的氨基酸片段；而 MDM2 所扮演的即是這條路徑中之 E3 的角色。

許多病毒蛋白都可以使 p53 失去功能，大部分的病毒蛋白都是透過與 p53 蛋白結合使 p53 蛋白失去調控細胞週期的功能，如：SV40 病毒的 large T 細胞抗原、adenovirus 2 及 5 的 E1b 蛋白 (James et al., 2001)。但是人類乳突狀病毒 (HPV) 的 E6 蛋白則是與 p53 蛋白結合並透過 ubiquitin pathway 而使 p53 蛋白水解，進而影響 p53 調控細胞週期的功能，其詳細之作用機轉將於後節敘述 (Scheffner et al., 1990; Talis et al., 1998)。

p53 蛋白的磷酸化或是其他基因的調控也會造成 p53-mdm2 間的交互作

用失去平衡而使 p53 失去功能。已有研究指出當 DNA 受到損傷時，會引發一些 kinase 作用，使 p53 蛋白在不同的位置發生磷酸化 (Meek et al., 1998)。 *In vitro* 實驗證實，有一些磷酸化酵素，包括 ATM、ATR、DNA-PK、JNK 及 CKI 可以磷酸化 p53 蛋白的 N 端 (Jayaraman et al., 1999)。而內生性的 p53 在 DNA 受到損傷時，其 Ser-15、20、33 及 33 的位置會被磷酸化；已經有文獻指出，ATM 和 ATR 可以在 *in vivo* 的情況下，將 p53 蛋白之 serine15 的位置磷酸化 (Khanna et al., 1998 ; Tibbetts et al., 1999)。當 p53 的 N 端磷酸化後，會降低 mdm2 與 p53 蛋白的結合能力，而使 p53 蛋白穩定存在。當 DNA 受到損傷時，DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) 會磷酸化 p53 N 端的 serine 和 threonine，而使 p53 和 mdm2 之間的作用下降，造成 p53-mdm2 間的交互作用失去平衡而使 p53 失去功能。

另外，抑癌蛋白 p14^{ARF} 也會透過兩種路徑調控 p53-MDM2 間的交互作用。一為可抑制 MDM2 之 ubiquitin ligase 的功能，其次 p14 會抑制 MDM2 核輸出作用而將 MDM2 留在核仁中，進而抑制 p53 和 MDM2 結合，而使 MDM2 無法促進 p53 分解。

2.2.2. p16/Rb 調控路徑

細胞內有許多與癌症形成有關的調控路徑，而本論文僅就兩條調控路徑加以討論，一是 p53-MDM2 路徑；另一條則是 p16-Rb 路徑。p53-MDM2 路徑已於前節說明，此部份將就 p16-Rb 路徑做進一步之介紹。

2.2.2.1. p16 在肺癌形成之角色

CDKN2 基因可轉譯出兩個蛋白產物，p16 及 p14 兩者有不同的調控路

徑，p16 蛋白包含了 156 個胺基酸序列，其主要功能在抑制 cyclin-dependent kinase 4 及 6 (CDK 4, CDK6) 的功能。CDK4 及 CDK6 必須與 cyclin D 結合，才具有磷酸化 Rb 蛋白之活性。當 Rb 被磷酸化後就無法與 E2F 結合，因而 E2F 會被釋放出來，而使細胞繼續生長 (Fig. 5a)。因此若細胞中的 cyclin D1 大量表現，且 p16 失去功能時，細胞就會不斷增生而形成腫瘤 (Cordon-Cardo et al., 1997)。目前已知造成 p16 蛋白不表現的原因有，基因單股或雙股缺失、基因發生突變或轉錄起始區的甲基化 (Cordon-Cardo et al., 1997; Nobori et al., 1994; Cairns et al., 1994)。而由目前的研究結果推測，非小細胞肺癌病患 p16 蛋白的消失主要是因起始區的甲基化 (22% - 41%) 及基因的缺失突變 (0% - 83%) 所造成，而單一鹼基突變 (0% - 10%) 則影響較小 (Kurakawa et al., 2001; Kim et al., 2001; Zhou et al., 2001; Sharipo et al., 1995; Shimizu et al., 1995; Xiao et al., 1995; Washimi et al., 1995; Kinoshita et al., 1996; Kratzke et al., 1996; Marchetti et al., 1997; Betticher et al., 1997)。在非小細胞肺癌的相關研究中，約有 27-67% 的肺癌患者無法以免疫組織化學染色法測到 p16 蛋白 (Sharipo et al., 1995; Sakaguchi et al., 1996; Kinoshita et al., 1996; Kratzke et al., 1996; Taga et al., 1997; Betticher et al., 1997)。且 p16 蛋白不表現者之預後顯著較 p16 表現者差 (Kim et al., 2001; Chen et al., 2001)。

2.2.2.2. Rb 在肺癌形成之角色

Rb 蛋白 (p105) 包含了 928 個胺基酸序列，分子量為 105 kd，蛋白功能主要與磷酸化程度有關，其作用機制已於前節說明。Rb 基因是肺癌研究中第一個被發現與肺癌形成有關的抑癌基因 (Harbour et al., 1988; Yokota et al., 1989)。在小細胞肺癌的研究中約 90% 以上的肺癌患者 Rb 蛋白都不表現，因此 Rb 在小細胞肺癌的形成扮演重要角色 (Shimizu et

al., 1994; Cagle et al., 1997)。但在非小細胞肺癌的研究上，Rb 蛋白不表現的頻率則較低 (6% - 57%)，茲將過去有關 Rb 之研究結果整理於 Table 6 中。Rb 家族除了 p105 基因之外，還包括 p107 及 p130 基因，但這兩個基因與肺癌形成的關係仍不明確。過去有研究指出，在 Rb (p105) 不表現的細胞中，當 p107 或 p130 失去功能時都會增加細胞腫瘤化的能力 (Zalvide et al., 1995)，而在肺癌患者肺腫瘤組織中可偵測到 p130 基因 exon 19-22 位置發生結構移位突變 (frameshift mutation) (Claudio et al., 2000a; Claudio et al., 2000b)。儘管如此 p107 與 p130 基因突變與肺癌形成之相關性仍有待進一步研究。

有些病毒蛋白會直接影響 Rb 蛋白的活性。目前已知會影響 Rb 作用的病毒蛋白有 SV40 的 large T antigen 及 HPV 的 E7 蛋白，兩者均是透過與 Rb 結合，而使 E2F 被釋放出來，進而造成細胞的增生 (Fig. 5b; Testa et al., 2001)。

因此除了致癌基因及抑癌基因本身發生基因突變而造成蛋白功能改變之外，外來之病毒蛋白會參與改變這些基因產物之功能。有些病毒蛋白本身即為一種致癌蛋白，目前已知有些病毒感染與人類癌症之形成有關，例如人類乳突瘤病毒 (Human papillomavirus; HPV) 與人類子宮頸癌形成有關 (Zur Hausen and Schneider, 1987; Zur Hausen 1991)，EBV (Epstein-Barr virus) 則與鼻咽癌及 Burkitts 淋巴瘤的形成有關。成人 T 細胞白血病與 HTLV-1 (Human T cell lymphotropic virus I) 有關。肝癌的 B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus)，另外還有 CMV (cytomegalovirus) 及 HSV (herpes simplex virus) 這些病毒均具有使細胞癌化的能力。其中以人類乳突瘤病毒所轉譯出的 E6 及 E7 致癌蛋白與 p53 及 Rb 的降解及去活化之研究較多，但都僅止於腫瘤細胞內 (tumor cell *in vivo*) 之研究，甚少有腫瘤組織

內 (tumor tissue *in vivo*) 之研究。因此本研究將在肺腫瘤組織中探討 HPV 16/18 E6 和 E7 蛋白與 p53 及 Rb 蛋白去活化之相關性，以了解 HPV 16/18 的感染是否經由 p53 及 Rb 蛋白去活化，而參與了肺腫瘤之形成。

2.3. 環境因子與肺癌形成

2.3.1. 環境暴露之種類

在台灣，女性抽菸的比例較男性低的多，其比例為女性：男性 = 3%：60%)，女性抽菸人口約為 2-5% (Fig. 3)。而其他國家男、女生抽菸比例大約為百分之八十五及百分之三十五 (Koo et al., 1990)。從台灣的肺癌患者之抽菸習慣來分析，約 80% 之男性肺癌之病因可歸於抽菸行為，但女性肺癌則 85% 以上之患者，無法以抽菸來解釋。雖然眾所皆知抽菸是引起肺癌的主要原因，而所有癌症的死亡原因也約有 30-40% 可以抽菸來解釋 (Lobe et al., 1984)，但在美國近二十年來，抽菸人口由百分之五十降到百分之三十，四十五歲以下族群之肺癌死亡率的確有下降的趨勢，而五十歲以上的族群則沒有降低，反而有升高的現象 (Devesa et al., 1989)。在日本，抽菸人口也在逐年降低，但肺癌的罹患率卻逐年大幅增加，即使戒菸者仍會罹患肺癌，因此其他環境因子是否參與其肺癌的形成，將是重要之研究課題。另外，流行病學的研究指出，中國婦女抽菸人口的比例低於其他種族，但肺癌盛行率卻逐年升高 (Deng and Gao et al., 1985)。同時發現中國女性肺癌之細胞型態，大多屬肺腺癌 (MacLennan et al., 1977; Kung et al., 1984; Gao et al., 1987)。近年來台灣地區由於抽菸量降低，與抽菸相關性最高之鱗狀上皮細胞肺癌有逐年下降的趨勢，但是肺腺癌之發病率卻逐年增加 (Department of Health, ROC, 1984 - 2000)，過去研究都顯示與抽

菸有關之肺癌，主要為鱗狀上皮癌及未分化癌，但是台灣女性肺癌則都以腺癌為主，與抽菸之相關性較少。另外，由公賣局統計資料顯示，近年來香菸消售總額雖逐年增加，但肺癌患者仍以肺腺癌為主，似乎無法說明台灣肺腺癌為何增加之速度較鱗狀上皮癌快。台灣都市與鄉村地區，每人每年香菸平均消費量並無多大差異，但都市地區罹患肺癌之人數顯著高於鄉村地區，因此抽菸行為無法說明都會區民眾為何有較高罹患肺癌之危險性 (Tay et al., 1988)。這些證據均顯示，雖然香菸是引起肺癌的最主要因子。但在台灣可能有其他的環境因子參與不抽菸者之肺癌的形成。本論文將就環境致癌物暴露及微生物的感染兩部分做進一步之探討。

2.3.1.1. 環境暴露

已有許多研究發現，二手菸與肺癌之形成有關，最近的研究指出二手菸的成分大致和主動吸入之香菸成分相似，但因燃燒溫度較低，因此許多致癌物之濃度甚至比主動吸入之濃度還高，因此二手菸引起之細胞毒性及致突變性亦較主動吸入之香菸高 (Adlkofer et al., 2001)。Hirayama et al. (1981) 研究指出，不抽菸婦女的丈夫若有抽菸習慣時，發生肺癌的危險性較丈夫不抽菸者為高 (約 1.45-2 倍)。Chen et al. (1990) 調查分析台北地區民眾肺癌發生與暴露二手菸有關。但 Lee (1995) 以問卷調查 400 位日本結婚婦女暴露二手菸與肺癌之相關性時發現，丈夫抽菸之不抽菸婦女，其肺癌發生之危險性與暴露二手菸無直接的相關。在香港及中國大陸上海地區的研究報告也有相同結果 (Koo et al., 1985; Gao et al., 1987)。以上報告可能是評估二手菸之暴露標準不同，而得到不同的結果。在台灣地區之二手菸和肺癌發生雖然有相關，但二手菸與台灣女性肺癌的相關性，仍須進一步以更大之樣本數做更深入之流行病學研究。

除了抽菸及二手菸之外，與肺癌有關之環境污染源，還有如：汽機車排放物、廚房油煙、點燃拜香及蚊香所產生的煙霧等 (Lee et al., 1988 ; Lofroth et al., 1991 ; Li et al., 1993)。蚊香是台灣家庭室內常見的污染源。有研究結果顯示點燃蚊香所產生的煙霧與肺鱗狀上皮癌及肺腺癌有關，尤其是夜晚入睡時持續點燃蚊香與肺癌發生有顯著相關 (Chen et al., 1990)。本研究室過去發現拜香對哺乳類細胞之基因毒性並不低於二手菸，因此在室內點燃拜香亦有可能引起健康危害 (Chen et al., 1996)。

中國婦女長時間待在廚房中以煎、炒、煮等方式烹調食物，有可能與肺癌之形成有關。過去的研究顯示，烹調所產生的油煙與鼻煙癌和肺癌的發生有相關性 (Decoufle et al., 1978)。同時在中國大陸上海的研究發現，肺癌和烹調的方式 (Wu-Williams et al., 1990; Gao et al., 1987)、烹調的餐數、烹調時的油煙大小、烹調用油都有相關 (Gao et al., 1987)。而長期暴露於烹調油煙的廚師罹患呼吸道癌症的機率亦較其他癌症為高 (Dubrow et al., 1984; Coggon et al., 1986)。新加坡學者發現華人廚師罹患肺癌的機率較高 (Law et al., 1976)。另外，本實驗室過去從煎魚油煙萃取混合物中分析到含有 BaP 的成分，且以煎魚油煙處理肺腺癌細胞 CL-3 後，以液態層析質譜儀分析到 BPDE-N2-dG 鍵結物 (Yang et al., 2000)。已知 BPDE-N2-dG 是香菸中主要引起 p53 基因突變，而引起肺癌形成的主要致癌物，烹調油煙會引起此種 DNA 鍵結物的形成，似乎可用說明台灣婦女為何暴露油煙會引起肺癌高死亡率的重要毒理基礎。

個體罹患肺癌之危險性不同，除了和抽菸與暴露環境污染物之程度不同之外，個體對 DNA 傷害之易感性不同可能亦扮演重要的角色。Li et al. (2001) 以 BPDE 處理肺癌患者及非癌症者之血液淋巴球，以 ³²P-postlabelling 方法分析 BPDE-N2-dG 鍵結物之含量，結果發現在癌症

患者淋巴球所形成的 BPDE-N2-dG 鍵結物含量高於非癌症之控制組 (癌症患者：93.2 ± 89.3 adducts/10⁸ nucleotides；非癌症之控制組：63.7 ± 61.1 adducts/10⁸ nucleotides；P=0.001)。抽菸者白血球中所形成的 BPDE-N2-dG 鍵結物含量也較不抽菸者高，因此推測肺癌患者對 BPDE 所造成的 DNA 傷害有較高的易感性。具有 CYP1A1 m2/m2 基因型者，對 DNA 傷害之易感性高於 CYP1A1 m1/m1 者。而 GSTM1 null 者對 DNA 傷害之易感性也較高於 GSTM1 wild 者(Chen et al., 2001)。Risch et al. (1993) 發現抽菸的女性，罹患肺癌的危險性高 27.9 倍，且較抽菸的男性有 9.6 倍的危險性。Zang 及 Wynder (1996) 發現抽菸之女性罹患小細胞肺癌及肺腺癌之危險性為男性的 1.2 及 1.7 倍。Ryberg et al. (1994) 研究中指出在校正抽菸量之後，抽菸之女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量顯著高於抽菸之男性肺癌患者。由以上結果得知，男性肺癌患者與女性肺癌患者對環境污染物，可能有不同之感受性，因此本研究將比較分析不抽菸之男、女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量，以了解男、女性患者是否對環境污染物有不同之感受性？

2.3.2. 微生物感染

2.3.2.1. 人類乳突瘤病毒 (Human Papillomavirus; HPV) 的種類

人類乳突瘤病毒屬於巴波法病毒族 (papovavirus) 的成員之一，直徑約 55 nm，基因體是由 7.9 kilobase 雙股環狀 DNA 所組成，病毒外觀為正二十面體，無封套膜 (envelope)。目前已發現的人類乳突瘤病毒約有一百多種 (Chan et al., 1995; Hart et al., 2001)，其分類標準是依據 E6、E7 及 L1 的 DNA 序列之不同而區分出不同型之 HPV。當 E6、E7 及 L1 之 DNA 序列差異大於 10%，則為不同型 (type)，DNA 序列差異在 2-10% 之間，則稱

為次型 (subtype) ; DNA 序列差異小於 2% , 則稱為變異種 (variant) (van Ranst et al., 1993)。HPV 亦可依感染部位不同區分為兩類, 一類是以感染皮膚為主, 多屬於良性、自我限制的表皮腫瘤, 與人體的免疫機制有關; 另一類則以感染黏膜為主, 大多感染在生殖道、呼吸道、口腔及結膜。感染生殖區的 HPV 又可依其細胞轉形能力不同區分為高危險型 (High-risk) 及低危險型 (Low-risk) 兩種。高危險型之 HPV 轉譯出來的 E6 及 E7 蛋白具有使細胞不死 (immortalize) 及轉形 (transformation) 的能力, 而低危險型則能力較差。

HPV 基因可區分為三部份: Early region (E)、Late region (L) 及 Long control region (LCR); Early region 可轉譯出具有不同功能的病毒蛋白, Late region 主要轉譯出結構性蛋白, 製造病毒的蛋白體 (capsid), 而 Long control region 雖不能轉譯出蛋白但卻是重要的轉錄調控區。以下將這些基因之功能做一些介紹:

E1 蛋白:

E1 與 SV40 large T antigen 的功能有許多類似的部分 (Seo et al., 1993) 包括 (i) 具有 ATP-dependent 的 helicase 活性 (Yang et al., 1993), (ii) 具有與特殊序列之 DNA 結合之能力, (iii) 具有 DNA-dependent ATPase 活性, 及 (iv) 具有解開超螺旋 DNA 的能力。因此 E1 蛋白主要功能在結合到 LCR 中的複製起點促使病毒 DNA 開始複製 (Holt et al., 1994; Li et al., 1993)。

E2 蛋白:

E2 的 open reading frame 可轉譯出二到三種蛋白, 而這些蛋白扮演了轉錄因子及轉錄抑制者的角色 (Bouvard et al., 1994; Doorbar et al., 1990), E2 亦會增加 E1 與 LCR 結合的能力而促進病毒 DNA 的轉錄作用。在高危險

型 HPV 中，E2 蛋白會經由與 E6/E7 promoter 之 TATA box 附近的 E2 binding site 鍵結，而抑制 E6/E7 基因的表現 (zur Hausen et al., 1994)。此外，E1 及 E2 與病毒嵌入宿主基因體有關，病毒主要利用 E1 及 E2 基因片段嵌入宿主基因，而使得 E2 基因無法表現進而無法抑制 E6 及 E7 基因的表現，使得宿主細胞不斷的複製增生 (zur Hausen et al., 1994)。

E4 蛋白：

目前並不清楚 E4 蛋白的功能，但有研究指出 E4 蛋白會累積在受 HPV 感染的分化層的上皮細胞中，並推測可能與病毒之成熟有關 (Doorbar et al., 1986; Palevsky et al., 1991a; Palevsky et al., 1991b)。Doorbar (1991) 及 Roberts (1993) 等人發現細胞中的 HPV 16 E4 蛋白具有使 cytokeratin 失去作用的能力，因此 E4 蛋白亦被推測可能與免疫系統對 HPV 的細胞毒殺作用 (cytotoxic) 有關。

E5 蛋白：

E5 蛋白具有使細胞轉形 (transform) 的能力，E5 蛋白被歸類為致癌蛋白，但其致癌性較 E6 及 E7 蛋白弱。目前知道 E5 蛋白會與 EGF (epidermal growth factor)、PDGF (platelet-derive growth factor)、ERBB1 及 ERBB4 之間有交互作用，而促進細胞增生及分化 (Hwang et al., 1995; Chang et al., 2001)。Oelze (1995) 等人也發現將 HPV 16 E5 送入人類角質細胞後會將組成細胞膜物質交換通道的膜蛋白 Cx43 (connexin 43) 去磷酸化，而使得 Cx43 蛋白穩定性下降，而使得細胞間通透的能力下降並促進細胞的增生及分化。

E6 蛋白：

為已知的致癌蛋白，整個蛋白包含 151 個胺基酸序列，會與 E7 協力造成人

類細胞的不死 (immortalization) (Munger et al., 1989), 但也有研究指出單獨的 E6 蛋白亦會造成細胞的轉形 (transform) 及不死 (Bund et al., 1990; Wazer et al., 1995)。E6 蛋白會使細胞癌化主要是透過與 p53 抑癌基因的交互作用, 詳細的作用機轉如 2.3.2.2 節所述。

E7 蛋白 :

為已知的致癌蛋白, 整個蛋白包含 98 個胺基酸序列, 亦會造成細胞的轉形 (transform) 及不死 (Phelps et al., 1992; Clemens et al., 1995)。E7 蛋白會使細胞癌化主要是透過與 Rb 抑癌基因結合, 而促使細胞的增生, 詳細的作用機轉如後節所述。

L1、L2 :

L1 及 L2 是屬於構造基因, 主要是負責製造病毒的蛋白體 (capsid), 但 L1 及 L2 只在分化完成的角質細胞中才會發現, 被稱為晚期基因。

LCR :

此段序列並未包含任何基因但具有 DNA 複製起點, 是重要的轉錄調節區。

2.3.2.2. HPV 的致癌機轉

HPV E6 蛋白與 p53 抑癌基因 :

HPV 可依其使細胞轉形的能力區分為高危險型 (high-risk; 包括 HPV16, 18, 45, 46 等) 及低危險型 (low-risk, 包括 HPV 6, 11, 42, 43, 44) (Lorincz et al., 1992; Schlegel et al., 1988)。Werness et al. (1990) 發現 HPV 16 及 HPV 18 E6 具有與 p53 蛋白結合的能力, 而 Schefiner et al. (1990) 證明了 E6 蛋白與 p53 的結合會使 p53 蛋白經由 ubiquitin 調控路徑被分解。

E6 對 p53 的降解作用主要是透過 E6AP (E6 association protein), 其作用機制如下: E6 先與 E6AP 結合後, p53 再與 E6 蛋白序列上的 p53 binding domain 結合, 而透過 ubiquitin 調控路徑分解 p53 (Huibregtse et al., 1991, 1993; Scheffner et al., 1993)。E6AP 分子量約 100 kd, 功能相當於 ubiquitin 調控路徑中的 E3 蛋白 (ubiquitin 調控路徑中 E1、E2 及 E3 之功能以敘述於前節) (Hershko et al., 1992)。在 E6 降解 p53 的過程中 E6 與 E6AP 必須同時存在 (Waddell and Jenkins, 1998), 當 E6AP 突變無法與 E6 結合或 p53 突變無法與 E6 結合, 都無法使 p53 降解 (Huibregtse et al., 1993; Scheffner et al., 1992), 因此在 p53 降解的過程中扮演 E3 ligase 角色的應該是 E6/E6AP 複合物, 而非僅有 E6AP 本身 (Nuber et al., 1998)。

另外, p53 基因 codon 72 的多形性也是影響 E6 降解 P53 能力的原因之一。p53 codon 72 基因多形性主要造成胺基酸序列由 Arg Pro 的變異, 族群的基因形有三種: Arg/Arg、Arg/Pro 及 Pro/Pro, 而以 Arg/Arg 對 E6 的易感性較高, Arg/Pro 次之, Pro/Pro 最差 (Kawaguchi et al., 2000; Marshall et al., 2000)。

HPV E7 蛋白與 Rb 抑癌基因:

由過去的研究得知 E7 主要是透過與低度磷酸化之 Rb 結合而達到使細胞轉形的作用 (Paggi et al., 1996)。高危險型及低危險型 HPV 的 E7 蛋白主要差異在與 Rb 結合的能力, 高危險型 HPV E7 蛋白與 Rb 結合能力較強, 因此致癌能力也較強 (Sang et al., 1992)。HPV 的 E7 蛋白是透過與 Rb 結合而使 E2F 被釋放出來而促使細胞的增生 (Fig. 5b; Joaeph et al., 2001)。但在 DNA 受到傷害而使 p53 活化而導致細胞週期停止時即使有 HPV E7 表現也無法使細胞增生 (Hickman et al., 1997; Helt et al., 2001)。HPV E7 不只能與 Rb (P105) 結合, 其餘的 Rb 家族成員, 如: p107 及 p130, 或其他與 E2F 有

關參與細胞由 G1 進入 S 期的調控蛋白也與 HPV E7 間有交互作用(Banks et al., 1990)。

另外，也有研究指出高危險型 E7 蛋白可以藉由兩條路徑調控 Rb 的磷酸化：一是促進 cyclin A 及 cyclin E 的產生及活化 cdk2 kinase，而促進 Rb 的磷酸化；另一條路徑是藉由與 CKIs p21 及 p27 結合而抑制其活性，促進 Rb 的磷酸化 (Zerfass-Thome et al., 1996; Jones et al., 1997; Funk et al., 1997)。

高危險型 HPV 轉譯出的致癌蛋白 E6 及 E7 均具有使細胞癌化的能力，且 HPV 確實參與了人類癌症的形成，但 HPV 與肺癌形成之相關性仍有待進一步釐清。

2.3.2.3. 人類乳突瘤病毒與肺癌形成之相關性

HPV 與其他癌症的相關研究：

目前有關 HPV 與人類癌症形成之研究，大多來自於子宮頸癌方面的研究。因為有 90% 的子宮頸癌患者有 HPV 的感染，尤其是高危險型之 HPV 16 及 18 (Zur Hausen, 1991)。由 IBSCC (International Biological Study on Cervical Cancer, 1995) 的報告指出，在分析 22 個國家的子宮頸癌患者中，僅有 7.1% 的患者是沒有感染 HPV。其不同型之 HPV 的感染率分別有 HPV 16, 49.9%; HPV 18, 13.7%; HPV 31/33/35, 7.2%; HPV 45, 8.4%，其他型 HPV 有 13.7%，沒有感染者有 7.1%。因此 HPV 感染與子宮頸癌有密切的相關性。但亦有研究指出，子宮頸抹片中細胞表現正常之婦女也有 5-80% 不等的 HPV 感染率，而此感染率在性行為活躍的時期會達到顛峰，之後 HPV 感染率便隨年齡增加而降低，在台灣流行病學的研究中也發現，子宮頸抹片中細胞表現正常的婦女其 HPV 的感染率也有 12.5%，且主要以 HPV 16 為主 (Taso et al.,

1994)，而在子宮頸癌患者中有 10% 的患者並沒有感染 HPV，因此 HPV 與子宮頸癌之相關性截至目前為止仍有許多爭議。此外，頭頸部癌症、膀胱癌、食道癌、支氣管癌及肺癌之腫瘤組織中也都發現有 HPV 的感染 (Viola et al., 2001 ; Haled et al., 2001 ; Serraino et al., 2001)，但這些癌症的形成與 HPV 之間的相關性仍有待釐清。

HPV 與肺癌的相關研究：

過去有研究發現高危險性的 HPV 16 及 18 可能在人類癌症的形成過程扮演了重要的角色 (Zur Hausen and Schneider, 1987; Zur Hausen 1991)。大於 90% 的子宮頸癌患者都有 HPV 的感染，尤其是 HPV 16 及 18 (Zur Hausen, 1991)。除了子宮頸癌之外，在膀胱癌、食道癌、支氣管癌，甚至肺癌亦都發現有 HPV 的感染。有關肺癌與 HPV 感染相關性之研究已有一些國家報告過。例如美國 (Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992)，日本 (Szabo et al., 1995; Hirayasu et al., 1996)、芬蘭 (Nouva et al., 1995; Soini et al., 1996)、挪威 (Henning et al., 1999)、法國 (Thomas et al., 1995) 及中國大陸 (Da et al., 1996) 等。他們報告之感染率由 0 - 80 % 不等，其結果整理於 Table 7 中。在美國及法國等國家的報告均指出在肺組織中的 HPV 感染率相當低，甚至測不到 (Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992; Thomas et al., 1995)。但在日本琉球卻有高達 80% 的感染率，且 HPV 感染的患者之存活率卻高於未感染者 (Iwamasa et al., 2000)。而在過去的研究中發現，肺鱗狀上皮細胞癌患者有高達 79% HPV 的感染 (Hirayasu et al., 1996)。亦有研究指出肺腺癌及肺鱗狀上皮細胞癌均可測到 HPV 的感染，且其感染率亦相當接近，肺腺癌有 9%，而肺鱗狀上皮細胞癌有 10% (Kinoshita et al., 1995)。Thomas et al. (1998) 的研究發現，在鱗狀上皮癌及腺細胞癌混合的肺癌患者，HPV 的感染率竟高達 78.3%，且在肺腺癌細胞及其鄰近鱗狀上皮癌細胞均可測到 HPV。由以上之結果得知，HPV 的感染與肺癌之相關性，似乎有人種和地域的關係，因此探

討 HPV 感染是否參與台灣肺癌之肺腫瘤形成，尤其在不抽菸之女性肺癌，是值得重視的研究課題。

3. 材料與方法：

3.1. 材料與藥品

3.1.1. DNA 萃取

SDS (sodium dodecyl sulfate), EDTA (ethylenedinitrilo, tetra-acetic, disodium salt), NaCl (sodium chloride), NaOH (sodium hydroxide), NaOAc (sodium citrate)以及 Tris-base 等化學藥品均購自德國 Merck 公司。Phenol, chloroform, ethanol 則購自台灣皓峰公司。Proteinase K 購自德國 Boehringer-Mannheim 公司。

3.1.2. DNA 鍵結物分析 (^{32}P -postlabeling ; ELISA)

Nuclease P1 (NP1), spleen phosphodiesterase (SPD) 購自德國 Boehringer Mannheim 公司。Micrococcal endonuclease (MN), potato apyrase (AP), bicine, p-nitrophenyl phosphate(pNPP)購自美國 SIGMA 公司。[γ - ^{32}P]-ATP 及抗體 anti-rabbit IgG-AP 均購自美國 NEN 公司。

3.1.3. 基因多形性 (genetic polymorphism) 及序列分析

諸如 DyNAzyme TM II DNA polymerase, BstUI, Msp I, 及 Bst NI 等多種酵素購自美國 Bio-Labs 公司, 另外 dNTP 及 primer 購自美國 Gibco BRL 公司。GENE CLEAN III kit 則來自美國 Bio101 公司。

3.1.4. 反轉錄聚合 連鎖反應 (RT-PCR)

用於此實驗中的 TRIzol Kit 及 RNasin 購自美國 Gibco BRL 公司。DNase, MgCl₂, isopropanol, DEPC (Diethyl pyrocarbonate), DL-Dithiothreitol (DTT) 購自美國 Sigma 公司。SDS, EDTA, NaOH, NaOAc 購自美國 Sigma 公司。DyNAzyme TM II DNA polymerase 購自美國 Bio-Labs 公司。另外 dNTP 及 primer 購自美國 Gibco BRL 公司。

3.1.5. 組織免疫化學染色 (IHC)

Xylene, ethanol 購自台灣皓峰公司。H₂O₂, NP-40 購自美國 Sigma 公司。Hematoxyline, citrate acid, Tris-base, EDTA, NaCl, Tris-base 購自德國 Boehringer-Mannheim 公司。分別辨識 Rb、MDM2、p16 及 cyclinD1 的一次抗體購自美國 Santa Cruz 公司。針對 p53 的一次抗體、LSAB (labelled streptavidin-biotin reagent), DAB (3,3' -Diaminobenzidine), primary Ab diluent, Dako pen 則購自丹麥 DAKO 公司。

3.1.6. 組織中 HPV DNA 之測定

DyNAzyme TM II DNA polymerase 購自美國 Bio-Labs 公司，另外 dNTP 及 primer 購自美國 Gibco BRL 公司。

3.1.7. 原位性雜交試驗 (*In situ* hybridization)

封套膜購自台灣每得科技公司。Proteinase K, dNTP 及 primer 購自美國 Gibco BRL 公司。DyNAzyme TM II DNA polymerase 購自美國 Bio-Labs 公司。另外 DIG、Anti-DIG-AP Ab、NBT/BCIP 購自美國 NEN 公司。

3.1.8. 原位反轉錄聚合 連鎖反應 (*In situ* RT-PCR)

Proteinase K, SuperScript TM II, RNase H, Reverse Transcriptase, primer 及 dNTP 購自美國 Gibco BRL 公司。DNase I 及 RNasin 購自美國 Promega 公司。包括 DIG、Anti-DIG-AP Ab、NBT/BCIP 購自美國 NEN 公司。Random primer, DyNAzyme TM II 及 DNA polymerase 則購自美國 Bio-Labs 公司。

3.2. 檢體收集

本研究所選取的非小細胞肺癌組織，皆由台中榮民總醫院胸腔外科所提供，檢體收集自 1993 年到 1999 年之間進行手術的肺癌病患，病理組織蠟塊則由台中榮民總醫院病理部所提供，並依據腫瘤大小 (T)、是否有淋巴結轉移 (N) 以及是否有遠端轉移 (M)，來決定其腫瘤分期。非癌症肺組織則由彰化基督教醫院及成大醫學院胸腔外科所提供，做為本實驗之非癌症控制組。組織取出後立即存放於-80 冰箱，以便日後分析之用。

3.3. 實驗方法

3.3.1. 肺癌病患非腫瘤組織樣本之 DNA 萃取

將 50-100 mg 的非腫瘤組織加入少量液態氮並加以研磨後，加入 500 μ l 的 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1M NaCl, 25mM EDTA 及 0.5% SDS) 將組織完全水解，再加入 5 μ l proteinase K (10mg/ml) 於 56 作用 12-18 小時，之後以傳統的 phenol/chloroform 法除去蛋白質。首先加入 500 μ l 的 phenol/ chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1) 充分混合使蛋白變性，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液再加入 500 μ l chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 洗去殘餘之 phenol，充分混合後以 12,000rpm 離心 15 分鐘，取上清液再加入 50 μ l 3M NaOAc (PH 5.2) 及 1 ml 的 100% 冰酒精於-20 冰箱作用 30 分鐘，藉以將 DNA 沉澱出。以 12,000 rpm 離心 20 分鐘後倒掉上清液，並加入 500 μ l 70% alcohol 洗去殘留之鹽類，12,000 rpm 離心 20 分鐘後倒掉上清液，並以真空抽乾殘餘的水分，所得之白色沉澱物即為 DNA。將沉澱出來之 DNA 以無菌水溶解並以紫外線光譜儀測定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A_{260}/A_{280} 比值

應在 1.6 到 1.8 之間。若比值小於 1.6 則表示蛋白含量過高，應再以 proteinase K 處理後重複上述萃取步驟；若比值大於 1.8 則表示 RNA 含量過高，則應再以 RNase 處理後重複上述萃取步驟。DNA 的濃度以下列的公式計算： $\text{DNA } (\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數}$ 。DNA 萃取完成後，溶成濃度為 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 置於 -80°C 冰箱保存，以用於 DNA 鍵結物及基因多形性之分析用。

3.3.2. 疏水性-DNA 鍵結物分析 - ^{32}P -postlabelling

本實驗步驟主要依據 Reddy (1990) 的方法進行。取 $2 \mu\text{g}$ DNA 加入含有 0.75 unit micrococcal endonuclease (MN) 和 $7.75 \mu\text{g}$ spleen phosphodiesterase (SPD) 的 succinate buffer 中，經 37°C 水浴反應 4 小時後，使 DNA 水解成 deoxyribonucleotides 3' monophosphate，再加入 $6 \mu\text{g}$ NP1 (nuclease P1)，sodium acetate 以及 ZnSO_4 於 37°C 反應 1 小時。加入含有 5 unit 之 T4 polynucleotide kinase 和 $1 \mu\text{l}$ 之 $10 \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的混合液，於 37°C 作用 1 小時以進行 postlabeling 反應，最後將此放射性標記過的 DNA 鍵結物反應液點在 PEI-cellulose TLC plate 上，利用三種移動相，三個方向展開，每次展開後 TLC plate 都要經過剪除濾紙、洗片和晾乾的步驟。三種移動相分別為：D1： 0.65 M sodium phosphate (pH6.0)；D3： 3.6 M lithium formate, 8.5 M urea (pH3.5)；D4： 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris-base, 8.0 M urea (pH8.0)。展開後的 TLC 片先用蓋格計數器測定其放射線強度放入 X 光片夾中，以 TLC 片子上的放射性強度決定置於 -80°C 冰櫃中穩定顯影的時間。曝光後，X 光片上會顯出 DNA 鍵結物的位置。另外，稀釋 DNA 水解溶液並以 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 標記所有核 酸(total nucleotides)，然後利用 40 mM ammonium sulfate (pH 5.27) 展開，確定所有核 酸之位置。定量時則依照 X 光底片上的相對位置，

將 PEI plate 上的 DNA 鍵結物與所有核 酸剪下，置於 Mini poly-Q vial 內，再加入 3 ml 閃爍計數液，以 Beckman L6500 Scintillation Counter 測定其放射線強度。 以下列公式計算 DNA 鍵結物知相對含量： Relative adduct labeling (RAL) = cpm in adducts/cpm in total nucleotides/dilution factor。

3.3.3. BaP 類似 DNA 鍵結物分析-酵素免疫結合吸附法 (ELISA; enzyme-link immunosorbent assay)

3.3.3.1. BPDE-DNA 製備

將 (±) Anti-BPDE (NCI repository, Midwest Research Institute, MO)溶於 THF (5 α -pregnane-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrol-20-one)buffer 中，並加入溶於 Tris buffer (pH 7.4)的小牛胸線 DNA，充分混合後在 37 作用 4 小時 (Venkatachalam et al., 1995)。以 n-butanol 及 isoamyl alcohol 萃取三次，加入 5 N NaCl 及 100% 冰酒精沉澱出 DNA，將沉澱出來之 DNA 溶於 TE buffer (5mM Bis-Tris, 0.1mM EDTA , pH 7.1)中。Modification 的程度以下列公式計算：

$$\% \text{ modification} = (A_{350}/29,000) \times 100 \{ [A_{260} - (0.18 \times A_{350}) / 6650] \}$$

此部份實驗由美國國家毒物研究中心(National Center of Toxicology Research , USA ; NCTR)的符必成博士實驗室所完成，所得 DNA 之 % modification 是 1.4 adduct/ 10² nucleotides。

3.3.3.2. BPDE 抗體製備

將合成之 BPDE-DNA-mBSA 0.5 mg 注射到八週大的新英格蘭白兔體內，四週後再注射 BPDE-DNA-mBSA 0.5 mg，二週後再注射 BPDE-DNA-mBSA 0.25 mg，注射後第十週取出兔子血清並以 ELISA 方式測得抗體活性，ELISA 分析方法如後敘述。抗體活性測試結果如 Fig. 6，抗體之 50% inhibition 為 16 fmol，相較於過去研究所發表之抗體有較高之敏感度 (Table 8)。此部份實驗由長庚大學公共衛生學科謝玲玲教授實驗室所完成。

3.3.3.3. 競爭性 ELISA

先將 BPDE-DNA 以 3 ng/100 μ l PBS 的濃度加到 96 well plate 中在 37 $^{\circ}$ C 反應 8 小時後以 PBS 洗去殘餘的鹽類後放置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存備用。將已鍵結 BPDE-DNA 之 96 孔 plate，以 300 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l 含 1% FBS 之 PBS 於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時以去除非特異性之結合反應，以 250 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l 含 1:5 $\times 10^5$ 稀釋之 BPDE-Ab 及待測 DNA 混合之混合液於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，以 300 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l 1:1 $\times 10^3$ 稀釋之 anti-rabbit IgG-AP 於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，以 300 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l PNPP solution 於室溫反應 15 分鐘(10mg/20ml 1M diethanolamine, pH 8.6)，加入 25 μ l 3N NaOH 以終止反應。以 OD 405/630nm 測吸光值，吸光值應介於 0.4-1 之間，每次實驗應以不同濃度之 BPDE-DNA 為標準品做一校正曲線，每次實驗之校正曲線誤差必須小於 $\pm 10\%$ ，待測樣本也以三次獨立實驗求得平均值及標準差。

3.3.4. CYP1A1 基因多形性之分析

CYP1A1 基因多形性之分析是利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism)方法, 取 100ng DNA 為模板進行 PCR 反應, PCR 反應條件如下: 100 ng DNA, 0.5 mM dNTP、5 μ l PCR 10 \times reaction buffer、2.5U Taq polymerase, 以及 0.5 mM primer。將所得之 PCR 產物取 12.5 μ l, 10 \times reaction buffer 1.5 μ l 及限制酵素 1 μ l 於 37 $^{\circ}$ C 反應 4 小時, 以 1.8 % agarose 膠體電泳進行結果分析, primer 序列及限制酵素之使用如下列所示:

CYP1A1 :

Primer : S 5' -TAGGAGTCTTGTCTGAGCCT-3'

AS 5' -CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'

Restriction enzyme : Msp I

結果判讀如下所示 :

homozygous wild type (m1/m1): 899 bp product

heterozygous (m1/m2) : 899 bp, 693 bp, 206 bp product

homozygous mutant type (m2/m2): 693 bp, 206 bp product

3.3.5. GSTM1 基因多形性之分析

GSTM1 基因多形性之分析是以具特異性的引子根據是否有 GSTM1 PCR 產物來判斷, 取 100 ng DNA 為模板進行 PCR 反應, PCR 反應條件如下: 100 ng DNA, 0.5 mM dNTP, 5 μ l PCR 10 \times reaction buffer, 2.5U Taq polymerase 及 0.5 mM primer。並以 β -actin primer 為指標以檢測此 PCR 反應是否正確。將所得之 PCR 產物以 2% agarose 膠體電泳進行結果分析, primer 序列如下列所示:

GSTM1 :

primer : S 5' -GAAGGTGGCCTCTCCTTGG-3'

AS 5' -AATTCTGGATTGTAGCAGAT-3'

結果之判讀如下所示 :

wild type : 177 bp product

null type: no PCR product

3.3.6. p53 基因序列分析

取 100ng DNA 為模板進行 PCR 反應 , PCR 反應條件如下 : 100 ng DNA、 0.5 mM dNTP、 5 μ l PCR10 \times reaction buffer、 2.5U Taq polymerase、 0.5 mM primer。 PCR 反應步驟為 , denaturing: 94 40 秒 , annealing: 54 40 秒 , 及 elongation : 72 40 秒 , 此循環重複 35 次 , 最後以 72 反應 6 分鐘。將此 PCR 產物以 GENE CLEAN III KIT (BIO 101, USA) 將其純化出來 , 其步驟為首先加入 3 倍體積的 NaI 混合均勻後加入 10 μ l EZ-GLASSMILK Suspension 於室溫下作用 10-15 分鐘 , 以 12,000 rpm 離心 1 分鐘 , 以 500 μ l NEW WASH buffer 清洗三次後將上清液完全去除 , 並置於 65 使其完全乾燥後加入 12 μ l H₂O , 充分混合後於室溫作用 10 分鐘 , 以 12,000 rpm 離心 1 分鐘後將上清液取出留做 DNA 定序用。DNA 定序是採 Dye Deoxy Terminator 方法 , 以 Perkin-Elmer Model 377 自動定序儀分析。 PCR 反應中所用的 primer 序列如下 :

Exon 5 S-5' TTCAACTCTGTCTCCTTCCT3'

AS-5' CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG3'

Exon 6 S-5' GCCTCTGATTCTCCTCACTGAT3'

AS-5' TTAACCCCTCCTCCCAGAGA3'

Exon 7 S-5' AGGCGCACTGGCCTCATCTT3'

AS-5' TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC3'

Exon 8 S-5' TTCCTTACTGCCTCTTGCTT3'

AS-5' AGGCATAACTGCACCCTTGG3'

3.3.7. K-ras codon12 基因突變測定

K-ras codon 12 基因突變之分析是利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism)方法，取 100ng DNA 為模板進行 PCR 反應，第一次 PCR 反應如下：DNA 1 μ l、0.5 mM dNTP、5 μ l 10 \times reaction buffer、2.5 U Taq polymerase 及 0.5 mM primer，最後以滅菌水將體積補到 50 μ l。PCR 反應步驟為，denature: 94 40 秒，annealing: 54 40 秒，及 elongation : 72 40 秒，此循環重複 30 次，最後以 72 反應 6 分鐘。將第一次反應產物取出 2 μ l 當成第二次 PCR 反應的模板，以特定的 primer 進行第二次 PCR 反應，PCR 反應條件同上。反應後取 10 μ l PCR 產物以 3% 電泳膠進行分析。將所得之 PCR 產物取 12.5 μ l，10 \times reaction buffer 1.5 μ l 及限制酵素 1 μ l 於 37 反應 4 小時，以 4% agarose 膠體電泳進行結果分析，primer 序列及限制酵素之使用如下列所示：

K-ras codon 12：

1⁰ RCR

Primer：S- 5' CATGTTCTAATATAGTCACA3'；

AS- 5' AACAAAGATTTACCTCTATTG 3'

2⁰ RCR

Primer：

S- 5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT3'；

AS- 5' TCAAAGAATGGTAATGCACC 3'

Restriction enzyme：BstN I

結果判讀如下所示：

wild type: 114 bp

mutant type: 143bp

uncut: 157 bp as an control

3.3.8. RNA 萃取和純化

3.3.8.1. RNA 萃取

約 50-100 mg 的組織，加入液態氮並研磨後加入 1 ml TRIzol，於室溫反應 10 分鐘以便水解組織，待組織完全水解後加入 200 μ l 氯仿 (chloroform) 混合均勻，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液，再加入 500 μ l isopropanol 於室溫反應 15 分鐘以便沈澱 RNA，之後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後除去上清液，將沈澱物以 75% 酒精去除殘留的鹽類，再離心留下 RNA 沈澱物，溶於 50 μ l 經過 DEPC 處理的 H₂O (DPEC-H₂O) 中。上述方法是依 TRIzol reagent (GIBCO, BRL, USA) 所附的說明書之步驟進行。細胞之 RNA 萃取方法同上。

3.3.8.2. RNA 純化

溶於 50 μ l DEPC H₂O 的 RNA，加入 10 μ l 100 mM MgCl₂/1M DTT, 0.1 μ l RNasin (25-50U)，0.1 μ l DNase I (6.94mg/ml)，40 μ l DEPC H₂O 於 37 反應 15 分鐘以去除多餘的 DNA 後，以 5 mM EDTA，750 mM sodium acetate，0.1% SDS，終止 DNase I 的反應。再以 phenol/chloroform 萃取去除蛋白，12,000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液，加入 500 μ l isopropanol 於室溫反應 15 分鐘以沈澱 RNA，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘倒掉上清

液，以 75% 酒精洗去殘留的鹽類，之後離心留下 RNA 沈澱物溶於 50 μ l DEPC-H₂O 中。在用於 RT-PCR 分析前，先以 denaturing agarose gel 膠體電泳確定 18S 及 28S rRNA 是否存在，以確保 RNA 的品質。以紫外線光譜儀測定 RNA 在波長 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A_{260}/A_{280} 比值應在 1.7 到 1.9 之間。RNA 的濃度以下列的公式計算： $RNA (\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{稀釋倍數}$ 。

3.3.8.3. MDM2 之 RT-PCR 分析

取 5 μ g RNA 以 5 pmole/ μ l oligo dT 為 primer，於 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，使 oligo dT 接合到 RNA 模板上，再加入 4 μ l 反轉錄酵素反應 buffer 及 2 μ l 0.1 M DTT，1 μ l 10 mM dNTP mix 在 42 $^{\circ}$ C 下作用 2 分鐘後，再加入 1 μ l 反轉錄酵素(reverse transcriptase)，在 42 $^{\circ}$ C 下作用 50 分鐘合成 cDNA 以用於 PCR 分析實驗。PCR 反應條件如下：1 μ l cDNA, 0.5 mM dNTP, 5 μ l PCR reaction buffer, 2.5U Taq polymerase, 0.5mM primer，所用 primer 的序列如下：

sense: 5'AATCATCGGACTCAGGTACA3';

antisense: 5'GTCAGCTAAGGAAATTCAGG3'，

其總反應體積為 50 μ l，先以 94 $^{\circ}$ C 25 秒, 54 $^{\circ}$ C 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 40 秒等反應條件重複 35 次，最後以 72 $^{\circ}$ C 反應 6 分鐘。反應所得之 PCR 產物以 2% agarose gel 進行電泳分析，並以 ethidium bromide 染色後以 Densitometer 定量。

3.3.9. 石蠟包埋檢體之製備

新鮮組織以 4% 福馬林隔夜固定後，以不同濃度酒精進行脫水，順序、濃度及時間如下：50% 酒精 5 分鐘、75% 酒精 15 分鐘、85% 酒精 15 分

鐘 95%酒精 15 分鐘 100%酒精 15 分鐘 100%酒精 15 分鐘 以及 xylene 15 分鐘。將脫水後的組織放入以 60 預溶的石蠟中浸泡 20 分鐘，將 xylene 置換出來後，再將組織放入溶好的石蠟中進行包埋，整個過程中應避免氣泡的產生，待石蠟凝固後隔天便可進行切片。

3.3.10. H & E 染色 (Hematoxyline & Eosin stain)

將 5 μm 厚之組織切片先以 xylene 脫蠟再以 100%、95%、85%、75%、50% 等高至低濃度之酒精覆水，以 Hematoxyline 染色 1 分鐘，將玻片置於流動的水中沖洗 10 分鐘，再以 Eosin Y 染色 1 分鐘後以低置至高濃度之酒精脫水，並以 xylene 將酒精置換出來後封片，但因 Eosin Y 會溶於酒精，因此脫水時間不宜過長。

3.3.11. 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry; IHC)

將石蠟包埋後的組織以 5 μm 的厚度加以切片，並進行免疫組織染色。先以 xylene 進行脫蠟，再以 100%、95%、80%、75% 等不同濃度的酒精覆水，利用 3% H_2O_2 於室溫反應 15 分鐘以阻斷內生性過氧化酵素反應後，將玻片放入 0.01 M citrate buffer 中以微波加熱 3 到 5 分鐘，於室溫冷卻直到 citrate buffer 恢復澄清，再放入 TBS buffer 中恢復 pH 值。以一次抗體在 37 反應 1 小時後，以 PBS 洗三次每次五分鐘，再以 LSAB Kit (DAKO, LSAB 2 Kit peroxidase) 連結呈色劑 DAB 加以呈色，並以 hematoxyline 進行背景染色後，將切片以介於 75% - 100% 的四種不同濃度酒精加以脫水。在以 xylene 將酒精置換出來後，封片並進行判讀。判讀方法以 < 10% 細胞表現的情形視為負反應，以 "-" 表示；10% 以上細胞

表現的情形視為正反應，以 '+' 表示。

3.3.12. 腫瘤組織之 DNA 萃取及 HPV DNA 之測定

將手術取下之組織以福馬林固定並以石蠟包埋，以 5 μ m 的厚度將組織切片，並以 H & E 染色（方法如前節所述）並請病理科醫師區別出腫瘤細胞，將腫瘤細胞挑至含有 50 μ l lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, pH 8.0) 的 microtube 中，再加入 1mg/ml 的 proteinase K 5 μ l，置於 56 $^{\circ}$ C 作用 18-24 個小時，直至組織完全水解為止。以等體積的 phenol/choloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 萃取後，以 100% 冰酒精將 DNA 沉澱出來，將沉澱出來的 DNA 溶於 10 μ l 的滅菌水中用於 PCR 反應。HPV DNA 的測定先以 MY09 及 MY11 為 primer 進行 PCR 反應檢定是否有 HPV 感染，再以具分型特異性的 primer 進行第二次 PCR 反應判定感染的 HPV 種類，primer 的序列如下：

Primer pair	Sequence (5' -3')	Predicted Size (bp)
Consensus primer		
MY09	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	448-454
MY11	CGTCCMARRGGAWACTGATC	
Nested primers		
16UP	TACTAACTTTAAGGAGTACC	223
16DN	GTGTATGTTTTTGACAAGCAATT	
18UP	CCAAATTTAAGCAGTATAGC	193
18DN	TTGTACAAAACGATATGTATCCA	
β -actin primer		
UP	CAGGGCGTGATGGTGGGCA	253
DN	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	

The primers for this study were the same as those reported by McNicol et al., 1999.

第一次 PCR 反應如下：DNA 1 μ l、0.5 mM dNTP、5 μ l 10 \times reaction buffer, 2.5 U Taq polymerase 及 0.5 mM primer, 最後以滅菌水將體積補到 50 μ l。PCR 反應步驟為 denaturing: 94 40 秒, annealing: 45 2 分鐘, 及 elongation: 72 40 秒, 此循環重複 40 次, 最後以 72 反應 6 分鐘。取出 5 μ l 第一次反應產物, 作為第二次 PCR 反應的模板, 以各型特定的 primer 進行第二次 PCR 反應, PCR 反應條件同上。反應後取 10 μ l PCR 終產物以 2% agarose 電泳膠進行分析。

3.3.13. p53 codon 72 之基因多形性分析

p53 codon 72 基因多形性之分析是利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 方法, 取 100ng DNA 為模板進行 PCR 反應, PCR 反應條件如下：100 ng DNA、0.5 mM dNTP、5 μ l PCR 10 \times reaction buffer、2.5 U Taq polymerase, 0.5 mM primer。將所得之 PCR 產物取 12.5 μ l, 10 \times reaction buffer, 1.5 μ l 及限制酵素 1 μ l 於 37 反應 4 小時, 以 2% agarose 膠體電泳進行結果分析, 使用之 primer 序列及限制酵素如下列所示：

p53 codon 72 :

Primer : S- 5' ATCTACAGTCCCCCTTGCCG3' ;

AS- 5' GCAACTGACCGTGCAAGTCA 3'

Restriction enzyme : BstUI

結果判讀如下所示：

Arg / Arg : 169, 127 bp product

Arg / Pro : 296, 169, 127 bp product

Pro/ Pro : 296 bp product

3.3.14. HPV DNA 之原位雜交試驗 (*In situ* hybridization)

將 5 μm 厚之組織切片先以 xylene 脫蠟，再以高至低濃度之酒精覆水，以 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度之 proteinase K 於 56 作用 10 分鐘，再以特定的探針於 42 反應 16-18 小時進行雜交反應（探針標定是以 PCR 反應的方式標定上 DIG-11-dUTP, PCR 反應條件如上所示），反應後以 2 \times SSC/0.1% SDS 於 65 清洗三次，每次 5 分鐘。再以 0.2 \times SSC/0.1% SDS 於 65 清洗三次，每次 5 分鐘，以洗去未黏合之探針。加入 blocking reagent 於 37 反應 1 小時後，以 Anti-DIG-AP (1:1000 稀釋) 於 37 反應 1 小時。以 PBS 洗去多餘的抗體，並重複此步驟三次，加入 NBT/BCIP 呈色並以 methylgreen 為背景染色。呈色後以水洗去多餘的染劑並以水膠封片。結果判讀以藍紫色呈色為正反應，若為綠色則為負反應。

3.3.15. HPV E6 及 E7 之原位反轉錄聚合 連鎖反應 (*In situ* RT-PCR)

將 5 μl 厚之組織切片先以 xylene 脫蠟，再以高至低濃度之酒精覆水，以 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 濃度之 proteinase K 於 56 作用 10 分鐘，以 DEPC-H₂O 洗去殘留的 proteinase K 之後，以 DNase 於 37 處理 30 分鐘以去除 DNA，以 DEPC-H₂O 洗去殘留的 DNase 並進行反轉錄反應，其反應條件如下：5 pmol/ μl oligo dT、2 μl 0.1 M DTT、1 μl 10 mM dNTP、4 μl reaction buffer 及 1 μl 反轉錄，分別於 72 10 分鐘，42 60 分鐘，65 10 分鐘的條件下反應。在以 DEPC-H₂O 清洗三次後進行 PCR 反應，PCR 反應條件如下：0.5 mM dNTP、5 μl 10 \times reaction buffer、2.5 U Taq polymerase、1 μl DIG-11-dUTP 及 0.5 mM primer，以滅菌水將體積補到 50 μl ，將此混合溶液放於玻片上，以 *in situ* PCR 機器進行反應，PCR 反應步驟為 denaturing:

94 30 秒，annealing: 45 2 分鐘，及 elongation : 72 60 秒，此循環重複 15 次，最後以 72 反應 6 分鐘。反應完後以 PBS 清洗三次，加入 blocking reagent 於 37 反應 1 小時，再以 Anti-DIG (1:1000 稀釋)於 37 反應 1 小時後，以 PBS 洗去多餘的抗體，並重複此步驟三次。最後加入 NBT/BCIP 呈色，並以 methylgreen 為背景染色。結果判讀以藍紫色呈色為正反應，若為綠色則為負反應。

3.3.16. 統計分析

本研究之統計是以 SPSS 統計軟體進行，臨床各因子與 DNA 鍵結物含量、CYP1A1 及 GSTM1 基因多形性、p53、Rb、P16、cyclinD1、mdm2 蛋白表現、及 HPV DNA、及 HPV E6/E7 mRNA 表現的統計分析，以卡方檢定(χ^2 -test)方法分析。DNA 鍵結物與罹患肺癌之危險性評估及女性肺癌患者對 DNA 傷害之易感性評估，以多變項邏輯式迴歸方式進行。本論文部分統計由長庚大學公共衛生學科謝玲玲教授協助完成。

4. 結果

4.1. 肺癌和非癌症患者之肺組織中 DNA 鍵結物含量之比較

為了了解肺癌患者肺組織中疏水性 DNA 鍵結物含量是否較非癌症患者高，本實驗收集了 73 位肺癌患者腫瘤周圍之非腫瘤肺組織及 33 位非癌症患者之肺組織，進行 DNA 鍵結物分析。病例和控制組之年齡、性別、抽菸習慣、CYP1A1 及 GST M1 基因型在統計上均無差異 (Table 9)。以 ^{32}P -postlabelling 的方法分析 73 位肺癌患者的 DNA 鍵結物含量最低為 2.4 adduct/ 10^8 nucleotides，最高為 147.1 adduct/ 10^8 nucleotides，所有病例組之 DNA 鍵結物含量之平均值為 49.58 ± 33.39 adduct/ 10^8 nucleotides，高、低鍵結物之含量差異有 61 倍之多。而控制組的 DNA 鍵結物含量，最低為 3.4 adduct/ 10^8 nucleotides，最高為 88.8 adduct/ 10^8 nucleotides，其平均值為 18.00 ± 15.39 adduct/ 10^8 nucleotides，高低差異僅有 26 倍。結果發現肺癌患者間 DNA 鍵結物之差異度較非癌症者大，同時發現肺癌患者之 DNA 鍵結物含量顯著高於非癌症患者 ($P < 0.001$ ；Table 10)。由於非癌症患者之肺組織主要來自氣胸、肺部感染或意外死亡之患者，因此將非癌症之控制組區分為感染性及非感染性兩組比較其 DNA 鍵結物含量；在 11 位感染性肺損傷患者的肺組織中之 DNA 鍵結物含量為 19.51 ± 11.74 adduct/ 10^8 nucleotides，而在 22 位非感染性肺損傷患者的肺組織中之 DNA 鍵結物含量為 17.25 ± 17.05 adduct/ 10^8 nucleotides，兩者間無統計上之差異 ($P = 0.302$)，這結果顯示控制組的 DNA 鍵結物含量並不會因感染與否而影響。因此推測肺癌患者對 DNA 傷害之感受性可能較非癌症者高。

4.2. DNA 鍵結物含量與抽菸之相關性

為了了解本實驗肺癌患者之抽菸量是否會影響 DNA 鍵結物形成？進一步就抽菸與 DNA 鍵結物含量進行分析。結果如 Table 10 所示，抽菸之肺癌患者的 DNA 鍵結物含量為 49.03 ± 37.21 adduct/ 10^8 nucleotides，不抽菸之肺癌患者的 DNA 鍵結物含量為 49.28 ± 30.73 adduct/ 10^8 nucleotides，兩者間在統計上並無顯著差異 ($P = 0.719$)。而抽菸之非癌症控制組的 DNA 鍵結物含量為 15.99 ± 8.52 adduct/ 10^8 nucleotides，不抽菸之非癌症控制組的 DNA 鍵結物含量為 19.01 ± 17.90 adduct/ 10^8 nucleotides，兩者間也沒有統計上的差異 ($P = 0.836$)。分析肺癌患者及非癌症者每年抽菸包數為單位之抽菸量與 DNA 鍵結物含量間的相關性，結果抽菸量與 DNA 鍵結物含量還是沒有相關性，甚至還有些負相關性 ($r = -0.067$, $P = 0.667$, Fig. 7)。因此推測環境致癌物暴露參與台灣肺癌患肺組織中 DNA 鍵結物形成之貢獻度可能不低於抽菸量。

4.3. DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 和 GSTM1 基因型及蛋白表現之相關性

過去研究顯示 CYP1A1 及 GST M1 參與多環芳香烴的代謝及解毒路徑，且 CYP1A1 及 GST M1 的基因型及蛋白表現會影響之多環芳香烴-DNA 鍵結物的形成 (Dunn et al., 1991; Rannug et al., 1995)。因此分析這兩種基因型及其蛋白表現與 DNA 鍵結物含量的相關性。結果顯示在肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物含量在 CYP1A1 m1/m1 (A) 基因型為 37.99 ± 24.22 adduct/ 10^8 nucleotides，CYP1A1 m1/m2 (B) 為 50.24 ± 30.80 adduct/ 10^8 nucleotides，CYP1A1 m2/m2 (C) 為 67.78 ± 45.27 adduct/ 10^8 nucleotides，三者間雖無統計上的差異 ($P = 0.081$)，但是具有 m2/m2 基因型者之 DNA 鍵結物含量似乎較其他兩種基因型者有較高之傾向。而非癌

症控制組之 DNA 鍵結物含量在 CYP1A1 m1/m1 基因型為 17.61 ± 10.78 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m2 為 21.38 ± 20.60 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m2/m2 為 13.25 ± 6.36 adduct/ 10^8 nucleotides , 其間沒有統計上之差異 ($P = 0.455$)。因此疏水性 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 之基因型沒有相關性。在 GST M1 基因型與 DNA 鍵結物含量間之相關性分析結果顯示, 肺癌患者其 DNA 鍵結物含量在 GST M1 null type (negative) 基因型為 50.06 ± 40.72 adduct/ 10^8 nucleotides , GST M1 wild type (positive) 為 43.93 ± 24.55 adduct/ 10^8 nucleotides , 兩者無統計上的差異 ($P = 0.350$) ; 而在非癌症之控制組也得到相同的結果, 非癌症控制組 DNA 鍵結物含量在 GST M1 無效形基因型為 16.94 ± 9.86 adduct/ 10^8 nucleotides , GST M1 非無效型為 19.14 ± 19.88 adduct/ 10^8 nucleotides ($P = 0.845$)。因此 DNA 鍵結物之含量與 GST M1 之基因型同樣沒有相關性。

DNA 鍵結物的形成是代謝與解毒路徑不平衡所導致的結果, 僅分析單一代謝基因或解毒基因之基因型可能無法解釋 DNA 鍵結物的形成, 因此將 CYP1A1 及 GST M1 之基因型合併來看, 結果發現癌症患者之 CYP1A1 m1/m1/GSTM1 null 之鍵結物含量為 50.96 ± 29.79 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m1 /GSTM1 wild, 31.51 ± 18.73 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m2 or CYP1A1 m2/m2/GSTM1 null 之鍵結物含量為 57.62 ± 43.92 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m2 or CYP1A1 m2/m2/GSTM1 positive 之鍵結物含量為 52.58 ± 24.72 adduct/ 10^8 nucleotides , 雖然各組間在統計上沒有差異 ($P = 0.083$) , 但 CYP1A1m2/m2/GSTM1 null 的肺癌患者之 DNA 鍵結物含量, 較其他兩組基因型之肺癌患者有較高的趨勢。但在非癌症之控制組 CYP1A1 m1/m1/GSTM1 null 之鍵結物含量為 18.05 ± 12.32 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m1 / GSTM1 wild 之鍵結物含量為 17.17 ± 10.90

adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m2 or CYP1A1 m2/m2 / GSTM1 null 之鍵結物含量為 16.59 ± 9.54 adduct/ 10^8 nucleotides , CYP1A1 m1/m2 or CYP1A1 m2/m2 / GSTM1 positive 之鍵結物含量為 19.79 ± 22.46 adduct/ 10^8 nucleotides , 但在各組間都沒有差異 ($P = 0.956$)。綜合以上結果得知, 至少在本研究樣本的 DNA 鍵結物含量和 CYP1A1 及 GST M1 基因型沒有相關性。

本實驗以免疫組織化學分析腫瘤周圍正常肺組織之 CYP1A1 及 GST M1 蛋白表現, 以了解兩種蛋白表現與 DNA 鍵結物含量是否有相關性? 由於非癌症控制組及 9 位肺癌患者沒有病理組織切片, 因此僅分析 64 位有病理組織切片之肺癌患者之 CYP1A1 及 GST M1 蛋白表現, 而將肺癌患者依 DNA 鍵結物含量區分為低、中及高三組, 低組之 DNA 鍵結物含量為 2.4-29.27 adduct/ 10^8 nucleotides , 平均值為 15.58 ± 7.21 adduct/ 10^8 nucleotides , 中組之 DNA 鍵結物含量為 31.18-62.60 adduct/ 10^8 nucleotides , 平均值為 45.07 ± 10.73 adduct/ 10^8 nucleotides , 而高組之 DNA 鍵結物含量為 64.46-147.09 adduct/ 10^8 nucleotides , 平均值為 89.06 ± 26.62 adduct/ 10^8 nucleotides。比較三組之蛋白表現, 發現 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 蛋白表現具有統計上之差異 ($P = 0.036$; Table 11), 即 DNA 鍵結物含量較高之肺癌患者具有較高之 CYP1A1 蛋白表現量。但 DNA 鍵結物含量則與 GST M1 之蛋白表現無關 ($P = 0.131$)。綜合以上結果發現, 肺癌患者 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 蛋白表現有相關性而與 CYP1A1 和 GSTM1 兩種代謝解毒基因之基因多形性沒有相關性。

4.4. DNA 鍵結物含量做為肺癌的危險生物指標之多變項統計分析

為了了解 DNA 鍵結物含量、年齡、性別、抽菸狀態及 CYP1A1、GST M1 之基因型等因子何者較適合做為肺癌之危險指標，以多變項線性回歸做一統計分析 (Table 12)。以所有樣本之 DNA 鍵結物含量的中值為基準，將 DNA 鍵結物含量高於 48.66 adduct/ 10^8 nucleotides 為高組及 DNA 鍵結物含量低於或等於 48.66 adduct/ 10^8 nucleotides 為低組。結果發現 DNA 鍵結物含量較高者罹患肺癌危險性是較低者的 25.19 倍，在統計上有顯著的意義 (OR = 25.19, 95% CI, P = 0.003)。另外亦發現年齡可做為罹患肺癌之危險因子 (P = 0.02)。其他如性別、抽菸狀態、CYP1A1 及 GSTM1 之基因型，沒有達到統計意義。總之，本研究發現肺癌患者對 DNA 傷害較非癌症者有較高之易感性。而抽菸及代謝基因多形性並不影響 DNA 鍵結物之含量，但和 CYP1A1 蛋白之表現量有關。在多變項之分析結果更發現肺組織中 DNA 鍵結物含量可用來做為肺癌之危險指標。

4.5. 不抽菸女性肺癌患者對環境致癌物暴露之感受性

過去有研究指出在相同吸菸量的情況下，女性肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物含量遠高於男性肺癌患者 (Ryberg et al., 1994; Risch et al., 1993)，因此女性抽菸罹患肺癌的危險性可能較抽菸男性高 (Wang et al., 1996; Zang et al., 1996)。由於台灣婦女絕大多數是不抽菸者，因此本實驗收集 31 位女性和 31 位男性不抽菸之肺癌患者，這 62 位肺癌患者包括在比較肺癌及非癌症控制組 DNA 鍵結物含量實驗中的 38 位不抽菸之肺癌患者及另外選取之 9 位女性和 15 位男性不抽菸之肺癌患者，以增加分析之樣本數。並以 ^{32}P -postlabeling 和以 BPDE-N2-dG polyclonal antibody 之 ELISA 兩種方法，分析肺組織中 DNA 鍵結物含量，以了解女性肺癌患者

對環境污染物之感受性是否較男性高？首先比較不抽菸之肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量與不抽菸之非癌症控制組間是否和結果一所述一樣有差異？由 ^{32}P -postlabelling 分析發現肺癌患者之 DNA 鍵結物含量為 45.54 ± 33.36 adduct/ 10^8 nucleotides, DNA 鍵結物含量最高者為最低者之 77 倍；非癌症之控制組之 DNA 鍵結物含量為 19.06 ± 18.92 adduct/ 10^8 nucleotides, DNA 鍵結物含量最高者為最低者之 44 倍 ($P = 0.0001$; Fig. 8)。不抽菸肺癌患者之 DNA 鍵結物含量顯著高於非癌症者，這與先前之研究結果相符。而 ELISA 之分析結果與 ^{32}P -postlabeling 所得之結果相同，肺癌患者之 DNA 鍵結物含量 (23.04 ± 30.79 adduct/ 10^8 nucleotides) 顯著較非癌症者之 DNA 鍵結物含量 (2.11 ± 30.79 adduct/ 10^8 nucleotides) 為高 ($P = 0.01$, Fig. 8)。因此不抽菸之肺癌患者對環境致癌物之感受性可能較非癌症者高。另外發現 ELISA 及 ^{32}P -postlabeling 分析 DNA 鍵結物所得之結果具有正相關性 ($r = 0.352$; $P = 0.001$, Fig. 9)。這似乎暗示 ^{32}P -postlabeling 分析 DNA 鍵結物中主要部分是 BaP 類似之多環芳香烴 DNA 鍵結物。

為了了解不抽菸之女性肺癌患者是否與不抽菸之男性肺癌患者對暴露環境污染物有不同之感受性，我們進一步對不抽菸之女性及男性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量做一比較， ^{32}P -postlabeling 分析結果顯示不抽菸女性肺癌患者之 DNA 鍵結物含量為 49.23 ± 37.67 adduct/ 10^8 nucleotides, 不抽菸男性肺癌患者之 DNA 鍵結物含量為 31.17 ± 25.51 adduct/ 10^8 nucleotides, 兩者間具有顯著的差異 ($P = 0.014$; Fig. 10)而 ELISA 之分析也與 ^{32}P -postlabelling 分析所得之結果相同，不抽菸之女性肺癌患者之 DNA 鍵結物含量為 27.29 ± 34.63 adduct/ 10^8 nucleotides, 不抽菸之男性肺癌患者之 DNA 鍵結物含量為 9.45 ± 18.48 adduct/ 10^8 nucleotides, 其間有顯著之差異 ($P = 0.001$; Fig. 10)。不論是以 ^{32}P -postlabeling 或 ELISA 方

法分析，不抽菸之女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量均高於不抽菸之男性肺癌患者，因此推測女性肺癌患者對暴露環境致癌物所引起的 DNA 傷害可能具有較高之感受性。又由 ^{32}P -postlabelling 分析之 DNA 鍵結物輿圖，發現不抽菸之男、女性肺癌患者之 DNA 鍵結物輿圖並無明顯差異，但在抽菸肺癌患者之 DNA 鍵結物則有特異之表現輿圖，與 BPDE-DNA 鍵結物所呈現之表現輿圖類似 (Fig. 11)。這結果暗示抽菸及不抽菸肺癌患者 DNA 鍵結物形成的污染源可能有些不同，環境致癌物暴露對不抽菸肺癌患者 DNA 鍵結物之貢獻度，可能較二手菸為重要。

4.6. 不抽菸之男、女性肺癌患者 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 和 GST M1 基因型之相關性

由上述的研究結果得知，DNA 鍵結物含量上的差異與 CYP1A1 與 GST M1 之基因型無關，但為了了解男、女性肺癌患者 DNA 鍵結物含量上的差異，是否由於男、女性之 CYP1A1 與 GST M1 之基因型有差異所造成，因此將不抽菸之男、女性肺癌患者的 CYP1A1 與 GST M1 基因型做一比較分析，結果如 Table 12 所示。結果發現不論在 CYP1A1 或 GST M1 或將兩者合併來看，男、女性之 CYP1A1 與 GST M1 之基因型均沒有差異 (CYP1A1, $P = 0.617$; GSTM1, $P = 1.000$; CYP1A1/GSTM1, $P = 0.504$; Table 13)，因此不抽菸之男、女性肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物含量的差異與 CYP1A1 及 GSTM1 之基因多形性無關。

為了了解 CYP1A1 及 GST M1 基因型與 DNA 鍵結物形成之相關性，將 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 及 GST M1 基因型作進一步之比較 (Table 14)。 ^{32}P -postlabeling 分析 DNA 鍵結物含量高於 $15 \text{ adduct}/10^8 \text{ nucleotides}$ 為高 DNA 鍵結物組，低於 $15 \text{ adduct}/10^8 \text{ nucleotides}$ 為低 DNA 鍵結物組，

雖然 CYP1A1 m2/m2 / GSTM1 null 者其暴露污染源後形成 DNA 鍵結物的危險性為 CYP1A1 m1/m1, m1/m2/ GSTM1 positive 者的 2.82 倍，而 CYP1A1m2/m2/GSTM1 null 者之危險性也有 2.12 倍，但整體而言，DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 及 GST M1 基因型之間並無相關性 (P = 0.54)。在 ELISA 的分析結果與 CYP1A1 及 GST M1 之基因多形性做一比較，以能測到 DNA 鍵結物者為高 DNA 鍵結物組，無法測到者為低 DNA 鍵結物組，結果發現 CYP1A1 m2/m2 / GSTM1 null 者其暴露污染源後形成 DNA 鍵結物的危險性為 CYP1A1 m1/m1, m1/m2/ GSTM1 positive 者的 6.55 倍，而 CYP1A1m2/m2/GSTM1 positive 者之危險性也有 2.73 倍 (P = 0.04)。由此結果得知，CYP1A1m2/m2 基因型者不論其 GSTM1 基因型為 null 或 positive 形成 DNA 鍵結物的感受性均較 CYP1A1 m1/m1, m1/m2 者高，因此推測 CYP1A1 基因型對 DNA 鍵結物形成的影響似乎比 GSTM1 重要。另外，由 ELISA 分析所得之結果與 CYP1A1 及 GSTM1 之基因多形性有關，而 ³²P-postlabeling 分析所得之結果則沒有相關性，因此推測 CYP1A1 及 GSTM1 之基因型與 BPDE-like DNA 鍵結物之形成較具相關性。

4.7. 肺癌與性別交互作用對 DNA 鍵結物含量之影響

由上述結果得知，女性肺癌患者之 DNA 鍵結物含量高於男性肺癌患者。為確定女性肺癌 DNA 鍵結物確實有較高之危險性，分析肺癌與性別交互作用是否會影響 DNA 鍵結物之分析？本分析將所有樣本分為男性非癌症組、男性肺癌患者、女性非癌症組及女性肺癌患者等四組，以不抽菸男性非癌症控制組之 OR 值設定為 1。同樣以 DNA 鍵結物之中值將樣本區分為高、低兩組，由 ³²p-postlabeling 的結果分析，發現女性肺癌患者形成 DNA 鍵結物較高的危險性是男性非癌症控制組的 7.71 倍 (95% CI =

1.48-44.09)，而男性肺癌患者則是男性非癌症控制組的 3.29 倍(95% CI = 0.76-14.82；Table 15)，女性不抽菸之非癌症控制組也有 1.71 倍的危險性，這結果的趨勢具有統計上的意義 ($P = 0.003$)，但是由 95% CI 值顯示僅有不抽菸女性肺癌患者達到統計意義。另外以 ELISA 的結果分析，亦得到相同的結果，即其趨勢具有統計意義 ($P = 0.01$)。但亦僅有女性肺癌患者形成 DNA 鍵結物的危險性，是男性非癌症控制組的 6.25 倍 (95% CI = 1.33-31.47)，具有統計上之意義。以上結果得知，不抽菸女性肺癌患者確實具有較高之 DNA 鍵結物含量。

4.8. 不同性別與抽菸習慣的肺癌患者之 p53 蛋白表現之比較

本研究室過去研究 p53 突變分析，發現台灣肺癌患者肺組織中的 p53 基因突變頻率偏低，僅佔 11.6% (19/163)，但過去研究均指出 p53 基因突變參與早期肺癌之形成。本實驗以免疫組織化學染色法，分析肺癌患者肺腫瘤組織中 p53 蛋白的表現，以了解 p53 蛋白表現與肺癌形成之相關性。結果如 Table 16 所示。有 86.7% 女性肺癌患者無法在肺腫瘤組織中偵測到 p53 蛋白的存在，而男性肺癌患者僅有 53.3% 無法偵測到，顯示女性肺癌患者 p53 蛋白不表現之頻率顯著高於男性患者 ($p < 0.0001$)，又發現不抽菸之肺癌患者肺腫瘤組織中，無法偵測到 p53 蛋白的頻率高於抽菸之肺癌患者 ($P < 0.0001$)。另外亦發現肺腺癌患者 p53 蛋白偵測不到的頻率遠高於鱗狀上皮細胞癌 ($P < 0.0001$)，這可能是由於女性患者全部都是不抽菸者，且有 82.2% (37/45) 的女性患者是肺腺癌。此外，p53 蛋白之表現與腫瘤大小有關，腫瘤越大，在肺腫瘤組織中無法測到 p53 蛋白的頻則越高 ($P=0.011$)。Maki et al. (1996) 的研究中指出當 DNA 受到傷害時，p53 蛋白的半生期會由原來的 15-25 分鐘延長至 2-4 小時，而使細胞週期停止，以便進行 DNA 修復。由前述 DNA 鍵結物含量之研究結果發現，女性肺癌患者肺組織中

之 DNA 鍵結物含量顯著高於男性肺癌患者，但是本研究結果卻發現，女性肺癌患者 p53 蛋白偵測不到之頻率顯著高於男性患者，這結果顯然無法以過去研究的結果解釋。因此推測可能有其他因子參與了 p53 蛋白的去活化或蛋白分解。

4.9. p53 與 MDM2 蛋白表現之相關性

p53 及 MDM2 之間具有相互調控的機轉，p53 是 MDM2 的轉錄因子，而 MDM2 卻會經由 ubiquitin-proteasome 調控路徑分解 p53 蛋白。因此分析 MDM2 蛋白在肺腫瘤組織中的表現情形，以了解 p53 蛋白在腫瘤組織中偵測不到是否與 MDM2 蛋白表現有關。分析結果如 Table 16 所示，MDM2 的表現具有性別上的差異，在女性肺癌患者肺組織中可以測到 MDM2 蛋白的頻率為 62.2%，顯著高於男性肺癌患者 (43.5% $P = 0.046$)，這結果似乎可以用來解釋，女性肺癌患者 p53 蛋白偵測不到，可能是有較高之 MDM2 蛋白表現，參與 p53 蛋白之分解。因此將肺癌患者區分為女性不抽菸、男性不抽菸及男性抽菸三組，以比較三組間 p53 及 MDM2 蛋白的表現情形，由 Table 17 可知 p53 蛋白之表現在三組間有差異 ($P < 0.0001$)，不抽菸之女性及男性肺癌患者 p53 的蛋白表現沒有統計上的差異，但在抽菸及不抽菸之肺癌患者的比較上，可看到不抽菸之肺癌患者肺腫瘤組織中的 p53 蛋白大部分不表現，兩者間具有統計上的差異 ($P = 0.028$)，因此推測抽菸對 p53 蛋白的影響可能比性別之影響來得重要。雖然 MDM2 蛋白的表現在三者間統計上並沒有差異，但不抽菸女性肺癌患者 MDM2 蛋白表現頻率較不抽菸和抽菸男性患者有較高之趨勢 ($P = 0.082$)。為了釐清 MDM2 與 p53 蛋白表現間的相關性，進一步將 p53 及 MDM2 蛋白的表現區分為 p53-/MDM2-、p53-/MDM2+、p53+/MDM2- 及 p53+/MDM2+ 等四組 (Table 17)，以比較不同性別及抽菸習慣之肺癌患者間的差異，結果發現女

性肺癌 p53-/MDM2+ 的患者 (23/46, 51.1%) 顯著多於不抽菸之男性患者 (10/62, 16.1%)。而相反的 p53+/MDM2- 之女性患者 (1/45, 2.2%) 則遠低於不抽菸和抽菸男性患者 (7/30, 23.3% for nonsmoking male; 19/62, 30.6% for smoking male)。這結果顯示 51.1% 女性肺癌患者的 p53 蛋白消失，可能是被 MDM2 蛋白分解所致。而抽菸男性患者則可能是經由其他機轉造成 p53 蛋白不表現。因此導致抽菸及不抽菸肺癌患者 p53 蛋白不表現的調控機轉可能不同。另外，已知正常的 p53 蛋白的半生期僅有 15-25 分鐘，因此腫瘤組織中無法偵測到 p53 蛋白的表現，並不能證明 p53 蛋白具有正常蛋白功能，因此進一步分析肺癌患者肺腫瘤組織中之 MDM2 mRNA 的表現與 p53 蛋白表現之相關性，以了解 p53 蛋白是否具有轉錄活化 MDM2 mRNA 的能力，以確定 p53 蛋白是否具有功能。在本實驗之 137 位肺癌患者僅有 92 位有手術取得之腫瘤組織，可供萃取 RNA 進行 MDM2 mRNA 之 RT-PCR 分析。由 Table 17 之結果得知，在 67 位 p53 蛋白不表現之肺癌患者中有 40 位偵測不到 MDM2 mRNA 的表現，其頻率高達 59.7%，這結果顯示肺組織中之 p53 蛋白可能已失去活性，而無法轉錄活化 MDM2 mRNA 的表現，而不抽菸之女性肺癌患者，31 位 p53 蛋白不表現之肺癌患者中，有 21 位偵測不到 MDM2 mRNA 的表現，其頻率高達 67.7%。因此女性患者 p53 蛋白的不表現頻率較高 (86.7%)，可能是有較高之 MDM2 蛋白表現 (62.2%)，參與 p53 蛋白之分解。同時又可由 MDM2 mRNA 有較高頻率之不表現，而獲知肺腫瘤組織中 p53 蛋白的不表現，可能是經由蛋白層次去活化，而非經由 p53 基因層次發生突變所致。

4.10. Rb 蛋白與肺癌之相關性

腫瘤的形成過程有兩條重要的調控路徑，一是 p53- MDM2 調控路徑；另一條則是 p16-Rb 調控路徑。因此分析 Rb 蛋白在肺癌患者肺腫瘤組織的表

現，結果發現 137 位患者中有 25 位患者可以偵測到 Rb 蛋白表現，即有 81.8% 肺癌患者沒有 Rb 蛋白表現，其不表現之頻率顯著高於過去所發表之報告 (Table 4)。而 Rb 蛋白與臨床資料之相關性分析的結果，發現女性肺癌患者不表現 Rb 蛋白的頻率顯著高於男性肺癌患者 (女性：95.6%，男性：75%， $P = 0.004$ ，Table 18)，不抽菸患者 Rb 蛋白不表現的頻率也高於抽菸患者 (不抽菸者：94.7%，抽菸者：66.1%； $P < 0.0001$)，且 Rb 蛋白之表現頻率在不同形式之腫瘤亦不同，即肺腺癌患者 Rb 蛋白的不表現頻率遠高於鱗狀上皮細胞癌 (肺腺癌, 97.5%，鱗狀上皮細胞癌, 60.3%， $P < 0.0001$)。以上分析結果與 p53 蛋白之結果類似，即不抽菸男性肺癌患者測不到 Rb 蛋白的頻率遠高於抽菸男性患者。因此由 Rb 蛋白之表現不同，推測抽菸與不抽菸之肺癌患者可能有不同的致腫瘤機轉。

4.11. Rb 蛋白的表現與 p16 蛋白表現之相關性

由於 Rb 蛋白的功能決定於其磷酸化，而 Rb 蛋白的磷酸化主要與 p16 及 cyclinD1 蛋白表現有關，當 p16 蛋白存在時，會抑制 CDK2 及 CDK4 的活性，而使 Rb 無法磷酸化，此時 Rb 就會與 E2F 結合，造成細胞停止生長。另外，cyclin D1 亦會影響 Rb 磷酸化，當 Cyclin D1 蛋白大量表現時，CDK2 及 CDK4 會被活化，而將 Rb 磷酸化。因此本實驗分析 p16 及 cyclinD1 蛋白在肺腫瘤組織中的表現，希望能釐清 Rb 蛋白不表現在肺腫瘤形成過程中是受到何種蛋白調控之影響？由 Table 18 中可知，有 77.4% 和 70.1% 的肺癌患者無法在其腫瘤組織中測到 p16 和 cyclin D1 蛋白的表現，且兩種蛋白的表現均與性別、抽菸習慣、腫瘤形式、腫瘤期別、腫瘤大小及淋巴結轉移等臨床因子沒有任何相關性。為了釐清抽菸及不抽菸之肺癌患者是否有不同的 Rb 調控路徑，因此進一步分析不抽菸女性、不抽菸男性及抽菸男性肺癌患者的 Rb、p16 及 cyclinD1 蛋白的表現，結果如

Table 19 所示。抽菸男性患者 Rb 蛋白的表現頻率顯著高於不抽菸男性患者 ($P=0.005$)，但在不抽菸之男女性患者間沒有差異，因此 Rb 蛋白表現與抽菸較有關，而與性別較無關。但三組間 p16 及 cyclinD1 的表現則沒有差異 (p16, $P=0.615$; cyclin D, $P=0.425$)。為了釐清 Rb 與 p16 蛋白之間的相關性，Rb 及 p16 蛋白的表現區分為 Rb-/p16-、Rb-/p16+、Rb+/p16- 及 Rb+/p16+ 等四組，以比較不同性別及抽菸習慣之肺癌患者間的差異，結果發現不抽菸之男、女性肺癌患者間沒有差異 ($P = 0.570$)，但是不抽菸女性 Rb-/p16- 的患者最多，可達 77.8% 的患者屬此類患者，而不抽菸和抽菸男性亦達 66.7% 和 53.2%。這結果顯示台灣女性肺癌患者，可能有較多之 p16 蛋白的不表現，而造成 Rb 蛋白較易發生磷酸化，而使 Rb 蛋白有較高頻率之不表現。又發現抽菸與不抽菸之男性患者間有顯著的差異 ($P = 0.027$)，其差異主要在抽菸男性 Rb+/p16- (22.5%) 和 Rb+/P16+ (31.4%) 的患者顯著多於不抽菸之男性患者，而不抽菸男性 Rb-/p16+ 的患者則較抽菸男性患者多。在 Rb 及 cyclinD1 表現的相關性中，則發現 cyclin D1 蛋白不表現有 89.6% (86/96; $P = 0.001$; Table 19) 的肺癌患者無法在肺腫瘤組織中測到 Rb 蛋白的表現；而當 cyclin D1 蛋白表現時，則只有 63.4% (26/41) 的肺癌患者無法在肺腫瘤組織中測到 Rb 蛋白的表現；這結果似乎並不能解釋 Rb 蛋白的消失，當 Rb 被磷酸化後半衰期會縮短，因此當 cyclin D1 大量表現時應該無法測到 Rb 蛋白的表現，而當 cyclin D1 蛋白表現時，卻有 63.4% (26/41) 的肺癌患者可以在肺腫瘤組織中測到 Rb 蛋白的表現，以上結果顯示除了 p16 及 cyclinD1 外可能有其他因子參與了 Rb 蛋白的調控。

由以上之免疫組織化學染色結果得知，肺癌患者肺腫瘤組織中有高頻率的 p53 及 Rb 蛋白不表現，且 mdm2 p16 及 cyclin D1 並不能完全解釋 p53 及 Rb 蛋白的不表現。因此推測可能有其他因子參與了 p53 及 Rb 去活化機

轉。

HPV 是目前已知會參與人類癌症的形成腫瘤病毒之一。此病毒所轉譯出來的 E6 及 E7 致癌蛋白，具有去活化 p53 及 Rb 蛋白的能力，其作用機轉已敘述於文獻綜論中。因此大膽假設 HPV 可能參與肺腫瘤組織中 p53 及 Rb 的去活化，因此分析肺腫瘤組織中是否有 HPV 之感染，以釐清 HPV 是否經由 p53 及 Rb 蛋白的去活化而參與肺癌之形成，尤其是台灣不抽菸女性肺癌。

4.12. HPV 感染與肺癌之相關性

為了釐清 HPV 與肺癌形成之相關性，本實驗分析了 141 位肺癌患者及 60 位非癌症之控制組肺組織中 HPV DNA 的感染情形，肺癌患者及非癌症控制組之基本資料如 Table 20 所示。肺癌患者之平均年齡為 63.02 ± 9.61 歲，非癌症控制組之平均年齡為 49.95 ± 15.14 歲，肺癌患者之平均年齡明顯大於非癌症之控制組 ($P < 0.001$)，在抽菸習慣上兩者也有差異，肺癌患者抽菸頻率較非癌症之控制組高 (肺癌患者抽菸者 44.7%；非癌症控制組抽菸者 20%)，因此兩者間的差異將以統計方法校正以去除兩種因子的干擾。首先以 nested-PCR 方法分析與人類癌症較有關之 HPV 16 及 HPV 18 兩種高危險型在肺腫瘤組織中的感染頻率，結果發現 HPV 16 及 HPV 18 在肺癌患者肺腫瘤組織中之感染率分別為 35.5% 及 41.1%，均高於非癌症之控制組的 15.0% 及 11.7%。由於 nested-PCR 方法需經過兩次 PCR 放大基因產物很容易有偽陽性的結果，為避免實驗上的誤差，又以原位雜交試驗 (In situ hybridization; ISH) 偵測肺腫瘤組織中是否有 HPV DNA 的感染，以便與 nested-PCR 的實驗結果作一比較，結果如 Table 21 和 Fig. 12 所示。HPV 16/18 的 DNA 均表現於腫瘤細胞中，而附近之非腫瘤細胞均測不到

HPV DNA 的存在 (Fig. 13)。在 HPV 16 DNA 的分析上，nested-PCR 及 ISH 兩者有 73.0% 的一致性；而在 HPV 18 兩者間的一致性為 85.8%，這兩種分析方法具有相當高的一致性 (Table 21)，顯示肺腫瘤組織中確實有 HPV 16/18 DNA 存在，而周圍正常組織都沒有偵測到 HPV 的 DNA。因此 HPV 16/18 的感染可能與肺癌形成有關。由於 ISH 的敏感度較 nested-PCR 低，因此本實驗選用 nested-PCR 之結果進行以下之統計分析。

4.13. 高危險型 HPV 16/18 感染與肺癌之相關性

由 nested-PCR 的分析結果顯示，台灣肺癌患者肺腫瘤組織中確實有 HPV 感染，且 HPV 16 及 HPV 18 分別有高達 35.5% 及 41.1% 的感染率。因此進一步將 HPV 16 及 HPV 18 的感染與性別及抽菸做一統計分析，並比較肺癌及非癌症控制組兩者間的差異。女性肺癌患者 HPV 16 及 HPV 18 之感染率均高於男性肺癌患者，女性肺癌患者 HPV 16 的感染率高達 60%，而男性肺癌患者只有 24.0% ($P=0.00007$; Table 22)，女性肺癌 HPV18 之 73.3%，男性 29.0% ($P=0.0000003$)，且 HPV 18 之感染率高於 HPV 16。不抽菸之肺癌患者 HPV 16 或 HPV 18 的感染率，均高於抽菸之肺癌患者 (HPV 16：不抽菸之肺癌患者 48.7%，抽菸之肺癌患者 29.0%； $P=0.0005$ ；HPV 18：不抽菸之肺癌患者 57.3%，抽菸之肺癌患者 20.6%； $P=0.00002$)。

另外，在肺癌患者與非癌症之控制組的比較上，女性肺癌患者之 HPV 16 及 HPV 18 之感染率均高於女性之非癌症控制組 (HPV16：肺癌患者 60.0%，非癌症控制組 18.2%； $P=0.031$ ；HPV18：肺癌患者 73.3%，非癌症控制組 9.1%； $P=0.0002$ ；Table 22)，但男性之肺癌患者與非癌症控制組之 HPV16 及 HPV18 的感染率則沒有統計上的差異 (HPV 16， $P=0.253$ ；HPV 18， $P=0.089$)。同時亦發現 HPV 16 及 HPV 18 在不抽菸之

肺癌患者及非癌症控制組之間的感染率不同，不抽菸之肺癌患者 HPV16 的感染率為 48.7%，顯著高於不抽菸之非癌症控制組 (14.6% ; P = 0.0002)，而在 HPV18 結果也是一樣 (不抽菸之肺癌患者 57.3%，不抽菸之非癌症控制組 12.5% ; P < 0.000001)。由以上結果得知，不抽菸女性肺癌患者有較高的 HPV 16 和 18 感染率。但 HPV 16 及 HPV 18 在肺癌的腫瘤化過程中扮演何種角色則需進一步之探討。

為了解 HPV 16/18 感染和臨床因子的相關性，因此將 HPV 16/18 感染與腫瘤細胞形式及腫瘤期別之間做一統計分析，結果如 Table 23 所示。肺腺癌患者的 HPV 16 感染率為 43.4%，而鱗狀上皮細胞癌患者則為 24.1%，顯示肺腺癌患者 HPV 16 和 18 的感染率都遠高於鱗狀上皮細胞癌患者 (肺腺癌患者：49.4%，鱗狀上皮細胞癌：29.3% ; P = 0.027)。由以上結果得知，肺腺癌患者 HPV 16 及 HPV 18 的感染率顯著高於鱗狀上皮細胞癌患者，這可能是因為肺腺癌患者有 74.7% (62/83) 為不抽菸者，而不抽菸之肺癌患者已發現有較高之 HPV 感染率所致，但 HPV 是否參與肺腺癌的形成則仍需進一步的研究。

在腫瘤期別的分析上，僅發現 HPV 16 的感染與腫瘤期別有統計上的意義，而 HPV 18 則無此相關性。第二期肺癌患者的 HPV 16 感染率顯著低於第一期及第三期之肺癌患者 (第一期：43.3%，第二期：19.0%，第三期：41.5% ; P = 0.029)。因此推測 HPV16 可能參與早期肺癌的形成。但為何第三期患者亦有較高之 HPV 感染率，則仍需進一步的探討。

由上述的實驗結果得知，HPV 感染有性別、腫瘤形式及抽菸習慣上的差異。因此進一步分析不同性別和抽菸習慣者罹患肺癌之危險性和 HPV 16/18 感染的相關性，由 Table 24 的結果顯示，當以抽菸男性感染 HPV 16/18 的危險性當 1，則發現不抽菸之女性肺癌患者，感染 HPV 16 的危險性是抽菸之男性肺癌患者的 6.38 倍，其 95% 信賴區間為 2.68-15.17，具有統計意義。

而不抽菸之男性肺癌患者感染 HPV 16 的危險性是抽菸之男性肺癌患者的 2.13 倍，但其 95% 信賴區間未達統計意義 (95% CI, 0.81-5.54)。當校正年齡、腫瘤細胞形式以及腫瘤期別，不抽菸之女性肺癌患者感染 HPV 16 的危險性雖然降低為 3.98，但 95% 信賴區間仍在有以意義的範圍內 (95% CI, 1.13-13.98)。在 HPV18 感染上，不抽菸之女性肺癌患者感染 HPV 18 的危險性與抽菸之男性肺癌患者相比竟高達 10.58 倍 (95% CI, 4.30-26.0)。當經過校正年齡、腫瘤形式及腫瘤期別之後，不抽菸之女性肺癌患者感染 HPV18 的危險性則增高至 11.66 倍 (95% CI, 2.94-46.27)。因此僅有不抽菸之台灣女性感染 HPV 16/18 可能與罹患肺癌有相關性，但 HPV 16/18 是否確實參與不抽菸台灣女性肺癌的形成，則需要進一步的研究。

4.14. 低危險型 HPV 6/11 與肺癌之相關性

為了了解低危險型之 HPV 6/11 是否參與肺癌形成，本研究進一步分析這兩種 HPV 在肺腫瘤組織的感染情形，發現 HPV 6 有高達 28.4% 的感染率，其感染率遠高於非癌症控制組。而 HPV 11 在肺癌和非癌症組間則無差異，都僅有 10% 左右之感染率，因此僅就 HPV6 感染情形與臨床因子做一比較分析。在 HPV 6 的感染與臨床因子間相關性分析上，又發現 HPV 6 的感染與性別及抽菸因子都有相關性，即男性肺癌患 HPV 6 感染率顯著高於女性 (男性：33.7%，女性：11.1%； $P = 0.002$)，而抽菸者之感染率亦高於不抽菸者 (抽菸者：39.1%，不抽菸者：17.3%； $P = 0.014$ ；Table 25)。而其他的臨床因子則均沒有達到統計意義。其中雖然腫瘤期別和淋巴結轉移兩種因子未達到統計意義，但是都有腫瘤期別和淋巴結轉移程度愈高，HPV 6 感染率愈降低的趨勢。這結果顯示 HPV 6 感染可能參與早期之肺癌形成。

4.15. HPV 感染與性別、抽菸習慣及臨床因子之比較

為了了解 HPV 6、HPV 16 及 HPV 18 的感染是否在抽菸男性、不抽菸男性和不抽菸女性患者三者間有不同之感染率，結果發現不論是抽菸或不抽菸之男性患者 HPV 6 的感染率均高於女性患者 ($P=0.007$; Table 26)，但在抽菸及不抽菸之男性患者間卻沒有差異 ($P=0.824$)，因此推測 HPV 6 可能與男性肺癌較有相關性。而 HPV 16 及 HPV 18 則在不抽菸之女性肺癌患者有較高的感染率 (HPV16 : $P=0.024$; HPV18 : $P=0.001$)。因此不抽菸之肺癌形成可能與高危險型之 HPV 16/18 之感染較有關，而抽菸之肺癌形成可能與低危險型之 HPV 6 較有相關性。

由上述結果得知 HPV 6、HPV 16 及 HPV 18 在抽菸及不抽菸之肺癌患者有不同的感染率，為了了解 HPV 6、HPV 16 及 HPV 18 在不同腫瘤形式和其肺癌腫瘤化過程所扮演的角色，因此比較不抽菸及抽菸之肺癌患者 HPV 6、HPV 16 及 HPV 18 感染與腫瘤形式和腫瘤期別的相關性，結果如 Table 27 顯示，不抽菸之肺癌患者 HPV 6、HPV 16 及 HPV 18 感染與腫瘤期別及腫瘤形式之間均無統計上的相關性，但 HPV 16 在第一期患者之感染率較第二期患者高 (第一期 : 55.2% , 16/29 ; 第二期 : 25.0% , 4/16) ，而第三期患者的感染率又有增加至 54.5%。這結果暗示 HPV 6 可能參與早期肺癌之形成，而晚期患者又增高，可能是晚期患者之免疫力較差而感染。

在抽菸之肺癌患者的分析結果中發現 HPV 6 的感染與腫瘤期別有關，第一期之肺癌患者的感染率顯著高於第二期及第三期之肺癌患者 (第一期 : 64.7% , 11/17 ; 第二期 : 38.5% , 10/26 ; 第三期 : 15% , 3/20)。由以上結果推測 HPV 6 可能參與抽菸肺癌之早期腫瘤化的過程，而 HPV 16 及 HPV 18 則可能參與不抽菸肺癌之形成。

4.16. HPV E6/E7 存在與 HPV 感染之相關性

HPV 16/18 所轉譯出的 E6 及 E7 蛋白具有使 p53 及 Rb 去活化的能力，亦是 HPV 16/18 使細胞腫瘤化的主要已知機轉。因此以原位反轉錄聚合連鎖反應 (*in situ* RT-PCR) 分析 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 在肺腫瘤組織中的表現，並與 HPV DNA 之感染做一比較，以了解 HPV 感染是否是經由 E6 和 E7 mRNA 表現而造成肺癌形成？但由於有 4 位肺癌患者沒有病理組織切片，因此僅分析 137 位肺癌患者肺組織中 HPV E6/E7 的表現 (Table 28)。在 46 位 HPV 16 感染的肺癌患者中有 54.3% (25/46) 在腫瘤組織中可偵測到 E6 mRNA 的表現，而 E7 mRNA 則有 39.1% (18/46) 可以被偵測到，而 91 位沒有 HPV16 DNA 感染的肺癌患者都沒有偵測到 E6 及 E7 mRNA 的表現，這結果可以確定前述 HPV DNA 偵測之實驗的正確性。而在 HPV 18 E6/E7 mRNA 的分析上也有相似的結果，在 54 位 HPV 18 感染的肺癌患者中有 50.0% (27/54) 在腫瘤組織中可偵測到 E6 mRNA 的表現，而 E7 mRNA 則有 44.4% (24/54) 可以被測到，而 83 位沒有 HPV 18 DNA 感染的肺癌患者，則都沒有偵測到 E6 及 E7 mRNA 的表現。雖然 HPV 18 DNA 在肺腫瘤組織中的感染率高於 HPV 16 DNA (HPV 18 : 41.1% ; HPV 16 : 35.5%)，但 HPV 16 及 HPV 18 E6/E7 mRNA 的表現率相近，因此推測 HPV 16 及 HPV 18 在肺癌的腫瘤化過程中所扮演的角色可能同樣重要。

4.17. HPV E6/E7 與肺癌之相關性

Table 29 顯示 HPV 16 及 HPV 18 E6 mRNA 表現與患者臨床病理資料的相關性。發現有 18.2% 的肺癌患者可偵測到 HPV16 E6 mRNA 的表現，而 HPV 18 E6 mRNA 則有 19.7%。且 HPV 16 或 HPV 18 E6 mRNA 的

表現與性別及腫瘤形式均有相關性，即女性肺癌患者肺腫瘤組織中的 HPV 16/18 E6 mRNA 表現率顯著高於男性患者，而不抽菸之肺癌患者 HPV 16/18 E6 mRNA 表現率都高於抽菸患者 (HPV 16 E6：女性 37.8%；男性 8.7%， $P < 0.0001$ ；抽菸者，9.7%，不抽菸者 25.3%， $P = 0.016$ ；HPV 18 E6：女性 37.8%，男性 10.9%， $P < 0.0001$ ，抽菸者，9.7%，不抽菸者 28.0%， $P = 0.009$)。另外，HPV 16 E6 mRNA 的表現與腫瘤大小亦有相關，即腫瘤越大，可偵測到 HPV 16 E6 mRNA 的表現率越高 (T1：11.1%，T4：33.3%； $P = 0.008$)。由以上結果得知，具有 HPV DNA 感染之肺癌患者的肺腫瘤組織，確實可偵測到 HPV 16 及 18 E6 mRNA 的存在，因此進一步證實 HPV 16/18 可能參與不抽菸女性肺癌之形成。

除了 E6 致癌蛋白外，HPV 16/18 的 E7 致癌蛋白亦具有致癌能力。已知 E7 致癌蛋白主要是與 Rb 結合，並降解去活化 Rb 蛋白，而使細胞增生。因此分析肺腫瘤組織中 HPV 16/18 E7 mRNA 的表現，以了解 HPV 16 及 18 E7 與肺癌形成之相關性。由 Table 30 中得知 HPV 16 E7 mRNA 的表現率為 13.1% (18/137)，而 HPV 18 E7 mRNA 的表現率為 17.5% (24/137)。E7 mRNA 的表現與臨床因子相關性之分析結果顯示，HPV 16 E7 mRNA 的表現僅在性別因子有統計上的差異 (女性 24.4%，男性 7.6%， $P = 0.0013$)，但 HPV 18 E7 mRNA 的表現則與性別、抽菸習慣及腫瘤大小等因子都有相關。女性肺癌患者之 HPV 18 E7 表現率為 37.8% (17/45) 高於男性患者 (7.6%，7/92， $P = 0.0001$)。不抽菸之肺癌患者 HPV 18 E7 表現率顯著高於抽菸之肺癌患者 (不抽菸者：26.7%，抽菸者：7.6%； $P = 0.003$)。另外，HPV 18 E7 的表現與腫瘤大小亦有相關，T1 患者之 HPV 18 E7 mRNA 的表現率顯著高於 T2, T3 及 T4，雖然在統計上有相關性，但由於 T1 和 T4 的樣本數過少，因此這部分結果尚需增加樣本數做進一步之確定。綜合以上結果得知，HPV 16/18 E7 mRNA 的表現對女性肺癌的形成所扮演之角色，可

能較男性患者來的重要。

4.18. HPV E6/E7 mRNA 與不抽菸女性肺癌之相關性

由上述結果得知，抽菸及性別與 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現有關。因此將肺癌患者區分為不抽菸之女性、不抽菸之及抽菸之男性患者等三組做進一步的分析，結果如 Table 31 所示，HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現，在此三組間主要差異在女性不抽菸之肺癌患者的表現率，均高於不抽菸男性及抽菸男性之肺癌患者 (HPV 16 E6 , $P < 0.001$; HPV 16 E7 , $P = 0.027$; HPV18 E6 , $P = 0.001$; HPV 18 E7 , $P < 0.001$)。同時發現造成 HPV16 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6 或 HPV 18 E7 mRNA 表現的差異，主要是性別因素的影響，而非抽菸的影響。這可由不抽菸之女性患者之表現率均高於不抽菸男性患者，雖然有些並沒有達到統計上的意義 (HPV 16 E6 , $P = 0.003$; HPV 16 E7 , $P = 0.063$; HPV 18 E6 , $P = 0.034$; HPV 18 E7 , $P = 0.008$)。但在抽菸與不抽菸之男性肺癌患者間則沒有任何差異 (HPV 16 E6 , $P = 1.000$; HPV 16 E7 , $P = 1.000$; HPV 18 E6 , $P = 0.723$; HPV 18 E7 , $P = 0.697$)。因此推測 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現可能主要參與女性不抽菸肺癌之形成。

4.19. HPV E6 與 p53 蛋白降解之間之相關性

高危險型 HPV 16/18 的 E6 蛋白主要參與 p53 蛋白降解的能力。而本研究前述之結果，發現女性肺癌患者 p53 蛋白不表現的頻率顯著高於男性，但 p53 基因突變的頻率卻較低，同時發現 mdm2 蛋白的表現並不能解釋為何 p53 蛋白在肺腫瘤組織中有如此高頻率的不表現。因此推測 HPV E6 可能參與女性肺癌患者 p53 蛋白的降解去活化作用。本實驗用連續肺腫

瘤病理切片，以原位反轉錄聚合連鎖反應及免疫組織化學染色法分別分析 E6 mRNA 及 p53 蛋白的表現，以了解 HPV E6 mRNA 的表現是否參與肺腫瘤組織中 p53 蛋白的不表現。結果如 Fig. 14 所示，p53 蛋白表現的腫瘤區域，HPV E6 mRNA 都無法偵測到，但是若有 HPV E6 mRNA 存在的區域，則 p53 蛋白都沒有表現。我們將此結果整理於 Table 32 中，結果顯示不抽菸女性 HPV E6 mRNA 表現之肺癌患者，p53 蛋白不表現之頻率高達 35.5% (16/45)，此頻率遠高於不抽菸 (10% ; 3/30) 及抽菸 (9.7% ; 6/62) 之男性肺癌患者，具有統計上的差異 ($P < 0.0001$)，若僅比較不抽菸之男、女性肺癌患者間也發現具有統計上的差異 ($P = 0.04$)，但在不抽菸及抽菸之男性肺癌患者間則沒有統計上的差異 ($P = 0.082$)。在 HPV 18 E6 mRNA 也發現相同的結果。因此推測 HPV 16/18 E6 mRNA 可能參與女性肺癌患者肺腫瘤組織中 p53 蛋白的降解，而造成肺癌的形成。

4.20. p53 codon 72 基因多形性與 HPV E6 降解 p53 蛋白之相關性

過去有些研究發現，p53 codon 72 的基因多形性與 HPV 去活化 p53 蛋白有關。即具有 p53 codon 72 Arg/Arg 基因型者對 HPV E6 的易感性較高，Arg/Pro 次之，Pro/Pro 最低 (Kawaguchi et al., 2000; Marhall et al., 2000)。因此本實驗首先以 RFLP-PCR 方式分析肺癌患者之 p53 codon72 基因多形性，以了解 HPV16/18 DNA 感染與 p53 codon72 polymorphism 之間的相關性，結果發現 HPV 16 DNA 感染與 P53 codon72 基因多形性沒有相關性 (Table 33)，但在 HPV 18 的感染上則發現 p53 codon 72 Arg/Arg 基因型者，HPV 18 的感染率較高 (57.8%, 26/45)，這與過去在子宮頸癌患者所得到的結果相似，因此推測 p53 codon 72 基因多形性與 HPV 18 感染可能有關係。為了進一步了解 p53 codon 72 基因多形性與 HPV 16 及 18 E6 降解 p53 蛋白之間的相關性，因此將 p53 codon72 基因多形性與 p53

蛋白表現及 HPV 16/18 E6 mRNA 表現間的相關性做一分析。首先將肺癌患者分為 HPV E6-/ p53- , HPV E6-/ p53+ HPV E6+/ p53- 及 HPV E6+/ p53+ 等四組，而與 p53 codon 72 基因多形性做相關性分析，結果如 Table 34 所示。不論 p53 codon72 之基因型為 Arg/Arg Arg/Pro 或 Pro/Pro 其 HPV 16/18 E6 降解 p53 蛋白頻率均沒有差異。由本研究得知，p53 codon72 基因多形性與 HPV16/18 E6 降解 p53 蛋白無關。因此肺腫瘤組織中 HPV 16/18 E6 降解 p53 蛋白與肺癌患者之 p53 基因多形性沒有相關性。

4.21. HPV 16/18 E7 與肺腫瘤組織中的 Rb 調控路徑之相關性

由過去研究已知 E7 主要是透過與 Rb 結合而使細胞增生和轉形 (Paggi et al., 1996)。因此本實驗同樣利用連續切片分別以原位反轉錄聚合連鎖反應及免疫組織化學染色法分析 E7 mRNA 及 Rb 蛋白的表現，以了解 HPV E7 mRNA 與肺腫瘤組織中 Rb 蛋白表現間的相關性，藉以釐清 HPV E7 是否經由 Rb 蛋白之去活化，而造成肺癌的形成。同樣在 Fig. 15 結果顯示 HPV E7 mRNA 的表現與 Rb 蛋白的表現與否具有相關性。當比較不抽菸女性肺癌患者、不抽菸男性及抽菸男性肺癌患者三組間 E7 mRNA 與 Rb 蛋白表現的相關性 (Table 32)，發現不抽菸女性 E7+/Rb- 肺癌患者 (35.6% ; 16/45 遠高於不抽菸 (6.7% ; 2/30) 及抽菸 (1.6% ; 1/62) 之男性肺癌患者 ($P < 0.0001$)，若只比較不抽菸之男、女性肺癌患者間也具有統計上的差異 ($P = 0.015$)，但在不抽菸及抽菸之男性肺癌患者間則沒有差異 ($P = 0.105$)，這結果顯示 HPV 16 E7 mRNA 可能主要參與女性肺癌患者肺腫瘤組織中 Rb 蛋白的去活化。但在 HPV 18 的分析結果中，具有 E7+/Rb- 的患者，在不抽菸之女性及男性肺癌患者兩者間 ($P = 0.002$) 以及在不抽菸及抽菸之男性肺癌患者間都具有統計上之差異 ($P = 0.008$) 這些都顯示不抽菸之女

性 HPV 18 E7+/Rb- 之肺癌患者遠高於不抽菸和抽菸男性肺癌患者。由以上結果推測 HPV16/18 E7 mRNA 可能主要參與女性肺癌患者肺腫瘤組織中 Rb 蛋白的去活化作用。

4.22. HPV 16/18 E6/E7 mRNA 表現與肺癌患者預後之相關性

為了釐清 HPV E6/E7 mRNA 表現在肺癌患者肺腫瘤組織中扮演的角色，本實驗將 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 表現與肺癌患者之預後做一統計分析，為了增加預後分析的可靠性，本實驗將存活率小於 90 天之患者刪除，因此僅分析 125 位肺癌患者之 HPV 16 及 HPV18 E6/E7 mRNA 與 p53/Rb 蛋白表現和其預後之相關性。結果發現肺癌患者 HPV 16 E6/E7 不表現，又 p53/Rb 表現或不表現者之三年存活率可達到 54.46%，而 HPV16 E6/E7 表現，又 p53/Rb 均不表現者，其三年存活率僅有 41.86%。因此 HPV 16 E6/E7 mRNA 表現，又有 p53/Rb 蛋白不表現之肺癌患者有較差之存活率。但並沒有達到統計上的顯著意義 ($P=0.0817$, Table 35)。在 HPV 18 則看不到兩者間的差異 ($P=0.468$)。這些結果暗示 HPV 16 E6/E7 mRNA 的表現較 HPV 18，有可能參與 p53/Rb 去活化而造成肺癌的形成。

5. 討論

5.1. 抽菸與環境致癌物暴露交互作用對 DNA 鍵結物形成之影響

過去許多研究均指出，抽菸是造成肺癌患者肺組織形成 DNA 鍵結物的主要原因，Phillips et al. (1988) 發現抽菸者抽菸的支數與其肺組織 PAH-DNA 鍵結物的含量有線性的相關性。Shinozaki et al. (1999) 發現 DNA 鍵結物的含量與抽菸的時間呈正相關性，而二手菸暴露則與 DNA 鍵結物含量無關。但在本研究卻發現抽菸並不會影響肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物的含量。DNA 鍵結物含量與抽菸量甚至有負相關的趨勢 ($r = -0.067, P=0.667$)。

為了解本研究 DNA 鍵結物含量與抽菸量無關，是否是台灣肺癌患者與過去研究報告之肺癌患者的吸煙量不同所致？由 Table 36 所整理之結果發現，台灣肺癌患者之抽菸量較其他國家有偏低的現象。但台灣抽菸之肺癌患者肺組織中 DNA 鍵結物的含量，卻顯著高於其他國家 (Phillips et al., 1988 ; Geneste et al., 1991 ; Alexandrov et al., 1992 ; Ryberg et al., 1994)。這結果顯示抽菸不是唯一的台灣肺癌患者 DNA 鍵結物之貢獻源，可能還有香菸以外之環境致癌物之貢獻，而造成台灣肺癌患者肺組織中有較高之 DNA 鍵結物。

香菸的廠牌及抽菸習慣會影響抽菸者肺組織中 DNA 鍵結物的形成。Hemminki et al. (1993) 的研究指出，菸草中含有 40 種以上已知的致癌物。而不同廠牌之菸草之致癌物含量亦不相同，這些致癌物在人體內會經由生物轉換作用 (biotransformation)，形成活化代謝物後，攻擊 DNA 造成 DNA 鍵結物。本研究室過去曾比較台灣和美國之不同廠牌香菸萃取物

之致突變性，結果發現台灣香菸萃取物，對沙門氏桿菌造成的基因突變形式與美國香菸不同，台灣香菸萃取物主要是對 TA98 菌株產生致突變性，而美國香菸則是對 TA100 菌株產生較強的致突變性 (Chen et al., 1996)。已知引起 TA98 菌種突變的致突變物，是屬於引起移位結構突變 (Frameshift mutation) 之致突變物，TA100 菌種則主要為鹼基互換突變 (Base substitution mutation)。這或許可用來解釋為何台灣肺癌患者 p53 基因突變以特異之多鹼基刪減突變 (deletion mutation) 頻率較高的可能原因。另外亦可用來說明台灣肺癌患者有較高之 DNA 鍵結物，或許是香菸成分不同所致。抽菸習慣與 DNA 鍵結物在肺組織中的形成量亦有關，抽菸時有使用濾嘴者，罹患肺癌的危險性低於不使用濾嘴者，但此兩者的危險性均高於不抽菸者 (Harvey et al., 1993)，但在 Utrecht et al. (2001) 的研究中卻發現抽菸者，為避免吸入過多的焦油而使用濾嘴，反而使抽菸者增加吸入的深度及吸入的時間，長久下來反而增加肺腺癌的罹患率。因此推測台灣肺癌患者有較高之 DNA 鍵結物或許是香菸成分、抽菸習慣以及開始抽菸之年齡不同都有可能影響 DNA 鍵結物之形成量，這些都有待流行病學之進一步研究。

當抽菸量或暴露污染量高到某一極限時，抽菸量或暴露污染量與 DNA 鍵結物形成呈非線性關係 (Lewtas et al., 1997 ; van Schooten et al. 1997)。van Schooten et al. (1997) 發現抽菸者，其周邊白血球中的 DNA 鍵結物含量與每天的抽菸量呈正相關，且同一族群之抽菸者抽菸兩個月後，其周邊白血球中所測得的 DNA 鍵結物含量，與兩個月前有很高的一致性，但抽菸六個月後兩者間則無相關性，因此推測當所暴露的污染源過高時，DNA 鍵結物含量與暴露量之間會有非線性的關係。Lewtas et al. (1997) 的研究指出暴露高量空氣污染物者之白血球，形成 PAH-DNA 鍵結物之含量，反而較暴露污染量較少者低，因此暴露高量污染量時，參與代謝活

化酵素可能被用盡，或是 DNA 修補酵素和解毒酵素被誘發，而導致高暴露時反而有較低的 DNA 鍵結物含量。本研究室過去的研究發現，台灣都會區空氣懸浮微粒中所含的 PAHs 含量遠高於其他地區，例如英國、美國、日本等主要都會區，尤其是 BaP、B[b]FA (Benzo[b]fluoranthene)及 B[g,h,i]P (Benzo[g,h,i]perylene) (Lee et al., 1994 ; Kuo et al., 1998)，而這些具有基因毒性或致癌性的 PAHs 可能參與肺組織中 DNA 鍵結物的形成。在本研究用同樣實驗條件之 ^{32}P -postlabeling 分析的抽菸與不抽菸之肺癌患者 DNA 鍵結物輿圖結果顯示，抽菸患者的 DNA 鍵結物表現輿圖與過去發表的輿圖並不相同，過去所發表之抽菸者 DNA 鍵結物輿圖大多呈 45° 之區域帶狀輿圖 (DRZ: diagonal radioactivity zone)，而本研究之抽菸或不抽菸患者 DNA 鍵結物都呈現多點狀之輿圖，且在 TLC 片下方大多會出現極性較高 DNA 鍵結物 (Fig. 11)。本研究室又以 IHC 方法分析居住在台東、高雄和台中地區之肺癌患者，肺腫瘤病理切片之周圍正常肺組織中，BaP 類似之 DNA 鍵結物含量，結果發現空氣懸浮微粒含量最低的台東肺癌患者 BaP 類似之 DNA 鍵結物的含量，顯著低於高雄與台中之肺癌患者 (Table 37; Cheng et al. unpublished data)。這結果與衛生署肺癌死亡率之統計資料顯示台東地區之肺癌死亡率，顯著低於台中和高雄地區的結果相符。因此台灣肺癌患者肺組織 DNA 鍵結物的形成，除了香菸之影響外，其他環境致癌物之暴露可能亦扮演重要的角色。因此由肺組織中 DNA 鍵結物可做為肺癌之危險生物標記的角度來看，環境致癌物暴露可能在台灣肺癌形成之貢獻度可能亦相當重要。

過去的研究指出 p53 及 K-ras 基因突變與抽菸有關 (Hussain et al., 2001)。而在本研究族群中，p53 基因突變頻率僅有 11.2%，且由突變形式來看，僅有 15.8% 的 p53 基因突變直接與抽菸中 BaP 的致癌物暴露有關。本研究室過去以 PCR-RFLP 方法分析 173 位肺癌患者肺腫瘤組織中 K-ras

codon 12 的突變頻率，在 173 位肺癌患者中僅有 5 位 K-ras codon 12 發生突變，其中三位為肺腺癌，兩位為鱗狀上皮細胞癌，這五位患者都是抽菸者 (Table 38)。本研究發現之 K-ras codon 12 突變頻率為 2.9% 顯著低於過去所發表之文獻 (Table 39 ; Cheng et al., unpublished data)。已知 K-ras codon 12 的基因突變大多與抽菸有關。因此由台灣肺癌患者 K-ras codon 12 之突變頻率顯著低於其他國家來看，抽菸無法解釋台灣肺癌患者有相對較高之 DNA 鍵結物，但又無法造成引起肺癌最重要之 p53 和 K-ras 兩種基因的突變率較高。這些結果都顯示抽菸與環境致癌物暴露之交互作用形成的 DNA 鍵結物較高，不能單由抽菸和環境致癌物之暴露量來看，可能要由改變了調控基因表現之訊號路徑，例如調控代謝活化 BaP 的 CYP1A1 和 COX-2 之 AhR 路徑和 NF- κ B 路徑被活化，而增加 CYP1A1 和 COX-2 的轉錄作用，進而形成更多的 BaP-DNA 鍵結物。因此推測這些高量之 DNA 鍵結物並不是在肺癌形成之起始期形成，而是在腫瘤形成起始後，改變細胞內參與調控代謝活化的訊號路徑所致。這些參與形成 DNA 鍵結物形成之訊號路徑將在第 5.2 節中說明。

Ryberg et al. (1994) 的研究結果發現，每日抽菸量在 15-20 支的肺癌患者，肺組織 DNA 鍵結物含量的差異竟高達 25 倍之多，並發現 GSTM1 null 者其肺組織中含有較高量之 DNA 鍵結物，且其罹患肺癌之危險性較高，這顯示個體參與代謝解毒致癌物之活性可能不同。已知酵素基因的多形性會影響此基因表現之酵素活性。Chen et al. (2001) 發現 GSTM1 基因型 null 者，不論其 CYP1A1 之基因型為 Ile/Val 或 Val/Val 者，其罹患肺癌的危險性都比 GSTM1 positive 者高，若抽菸超過 30 年以上的人，GSTM1 基因型 null 者罹患肺癌的危險性，比一般人高 3.47 倍。Bennett et al. (1999) 發現不抽菸之女性於二手菸之暴露下，GSTM1 之基因型 null 者罹患肺癌的危險性，是 GSTM1 positive 者的 2.6 倍，這些結果都顯示 GSTM1 基

因型為 null 者，可能對環境污染物暴露有較高的易感性。Nakachi et al. (1993) 的研究結果發現，CYP1A1 基因型為 Ile/Val 或 Val/Val 者，若同時為 GSTM1 null 者，罹患肺癌的危險性是 CYP1A1 wild type 又 GSTM1 positive 者的 16.1 倍。Carolyn et al. (2000) 也發現類似的結果。因此 CYP1A1 及 GSTM1 之基因多形性和肺癌形成的危險具有顯著相關。因此 CYP1A1 及 GSTM1 在香菸或環境污染物的代謝，進而形成 DNA 鍵結物上，扮演了重要的角色 (Nakachi et al., 1991 ; Okada et al., 1994 ; Nakachi et al., 1993 ; Kihara et al., 1995)。大多數的研究都支持，CYP1A1 及 GSTM1 之基因多形性與肺癌形成之危險性及 DNA 傷害之易感性是有相關性的，而本研究之結果卻沒有發現肺癌患者和非癌症控制組間之 CYP1A1 及 GSTM1 代謝解毒基因之基因多形性有差異，且 DNA 鍵結物含量與 CYP1A1 及 GSTM1 之基因多形性之間亦沒有相關。這或許是本研究之非癌症控制組人數過少所致。但若以 Lin et al. (2000) 之 296 位健康者為控制組之 CYP1A1 之基因型的分布發現，本研究之 33 位非癌症控制組 CYP1A1 m2/m2 者之頻率 (30%) 為 Lin 所發表之頻率 (13%) 的 2.3 倍。因此即使有較多的 CYP1A1m2/m2 者，仍然發現肺癌組和控制組 DNA 鍵結物含量之間有差異，還是沒有發現 CYP1A1 基因多形性與 DNA 鍵結物含量的相關性。由上述結果似乎符合後來之 Mollerup et al. (1999) 的發現，肺組織中 CYP1A1 mRNA 表現與 DNA 鍵結物含量呈正相關性 (Mollerup et al., 1999)。因此推測肺組織中 DNA 鍵結物形成，由致癌物之誘發 CYP1A1 基因表現的影響，可能較基因型的影響為重要。

DNA 鍵結物的形成除了與代謝解毒酵素有關之外，細胞的修補能力亦扮演重要的角色 (Shelds et al., 2000)。Wei et al. (1996) 比較肺癌患者及健康者控制組之周邊白血球對 BaP 活化代謝物-BPDE 處理形成之 BPDE-DNA 鍵結物之移除能力 (DNA repair capability, DRC) 有何不同？結果發現肺

癌患者之 DRC 顯著低於健康之正常人。同時發現從未抽菸的肺癌患者之 DRC (3.20 ± 2.8) 和正常人在統計上沒有差異。可是抽菸之肺癌患者之 DRC (3.32 ± 2.6) 和正常人就有顯著差異，而抽菸之正常人之 DRC (5.69 ± 3.7) 和不抽菸者 (4.20 ± 3.5) 統計上雖然沒有差異，但卻有增高的趨勢。因此吸菸可能會促進 DNA 修補之能力。因此推測抽菸及不抽菸之肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量沒有差異有可能是抽菸者其 DNA 修補能力被促進所致。

過去比較肺癌患者及非癌症控制組之周邊白血球的 DNA 鍵結物含量之研究多著重於香菸的影響，但是周圍組織之白血球中 DNA 鍵結物含量，並不能反應香菸致癌物對目標器官--肺組織中的含量。Wiencke et al. (1995) 分析比較 31 位肺癌患者周邊白血球及肺組織中之 DNA 鍵結物的含量，結果發現兩者的 DNA 鍵結物含量具有很高的一致性。但 van Schooten et al. (1992) 以 ^{32}P -postlabeling 及 ELISA 兩種方法比較 20 位肺癌患者肺組織及周邊白血球中的 DNA 鍵結物含量卻發現兩者的表現並無相關性。Tang et al. (1995) 分析 34 位肺癌患者週邊白血球、肺腫瘤及非腫瘤組織中 DNA 鍵結物的含量，又發現周邊白血球與肺腫瘤組織中的 DNA 鍵結物含量有很好的相關性，但與非腫瘤組織的相關性則較不顯著。因此周邊白血球中 DNA 鍵結物含量是否能反應肺組織中的 DNA 鍵結物之含量還需要進一步研究。

過去以周邊白血球中之 DNA 鍵結物含量做為罹患肺癌之危險指標，僅發現 DNA 鍵結物含量高者是低者的 7.7 倍 (Tang et al., 1995)。而在本研究卻發現肺癌患者肺組織中的 DNA 鍵結物含量高者，罹患肺癌的危險性是低者的 25 倍。這結果顯示以目標器官 DNA 鍵結物之含量，做為罹患癌症之危險指標比非目標器官適合。當然要取得患者肺組織，分析 DNA 鍵結物含量做危險指標確實較血液困難，但是以肺組織中的 DNA 鍵結物

含量做為肺癌之早期診斷的輔助指標，在臨床上或許能協助肺癌的早期診斷。

5.2. 不抽菸女性肺癌患者對環境致癌物引起之 DNA 傷害之易感性

在本研究首次報告不抽菸之女性肺癌患者，對環境暴露引起之 DNA 鍵結物含量，顯著高於不抽菸之男性患者。本結果進一步驗證女性對抽菸有較高之易感性之外，亦對環境致癌物之易感性也有較高之現象。

不抽菸女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量較高可能是由於女性對環境致癌物有較高之易感性。Ryberg et al. (1994) 研究中指出在校正抽菸量之後，抽菸之女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量，顯著高於抽菸之男性肺癌患者。而 Zang et al. (1996) 亦發現相同的結果。早在 1993 年 Risch et al. 就發現抽菸的女性罹患肺癌的危險性比不抽菸者高 27.9 倍。且較男性抽菸者罹患肺癌高 9.6 倍。這些結果都暗示，女性可能對香菸之致癌物有較高的感受性。這些研究都僅止於抽菸之男、女性肺癌患者間，比較抽菸所產生之 DNA 傷害的易感性，至於環境致癌物之暴露則都沒有相關的研究。這主要是國外 90 % 以上的肺癌可以用抽菸來解釋。同時亦較難收集到足夠之不抽菸肺癌患者肺組織進行研究。台灣抽菸的女性人口僅有 2-5% (Annual Report of Tobacco, Alcohol Consumption Investigation; Taiwan; Fig. 3)，因此研究不抽菸肺癌患者之 DNA 鍵結物，不僅能了解抽菸以外之環境致癌物對肺癌形成之角色，同時又能了解 DNA 傷害對不抽菸肺癌患者形成肺癌的貢獻度。

不抽菸之女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量高於不抽菸之男性肺癌患者，除了女性本身對 DNA 傷害具有較高之易感性外，其他環境因子可能也扮演重要的角色。根據流行病學的調查結果顯示，不同國家之

不抽菸女性肺癌患者的死亡率有相當大的差異，在 3.3 ~14.1/100,000 之間，可達 4 倍以上的差異。其中死亡率最低的是印度，而最高的則是在香港、夏威夷、新加坡、舊金山及台灣的華人女性 (Chen et al., 1990 ; Koo and Cho, 1990)。因此環境致癌物之暴露有可能參與中國婦女肺癌之形成。流行病學學者首先發現中國婦女以大火快炒方式烹調所產生大量的廚房油煙和肺癌之形成有關 (Koo and Ho, 1996 ; Risch et al., 1998)。Koo 及 Ho (1996) 在上海的研究中指出，暴露烹調廚房油煙與不抽菸女性罹患肺癌有關，但香港的研究卻沒有相關性發現其間的相關性 (Yang et al., 1998) 。 Ko et al. (1997, 2000, 2001) 的研究均指出，台灣不抽菸婦女在烹調時不使用排油煙機者，罹患肺癌之危險性，比使用排油煙機者高 8.3 倍。 Lee et al. (2001) 指出台灣不抽菸之女性肺癌患者罹患肺癌與抽油煙機的使用及炒菜習慣有關，約有 28.2% 之女性鱗狀上皮細胞癌與廚房油煙之暴露有關，而腺細胞癌更高達 47.7%。若婦女在廚房烹調的時間愈久，其罹患肺癌的機率愈高，同時發現若廚房改善通風設備後，會明顯降低罹患肺癌的危險性 (Liu et al., 1993)。本研究室過去的研究發現煎魚油煙萃取物處理肺腺癌細胞 CL-3 後，以 LC-MS 分析到 BPDE-N2-dG 鍵結物的存在，而此鍵結物為抽菸所引起之主要的鍵結物 (Yang et al., 2000)。因此廚房油煙可能是造成不抽菸女性有 BaP-like DNA 鍵結物含量較高的原因之一，本研究室最近的研究結果顯示，以煎魚油煙萃取物處理肺腺癌細胞 CL-3 時，油煙萃取物中的 acetaldehyde 會透過 NF B 調控路徑大量誘發 Cox-2 基因的表現 (Lin et al., submitted)。Cox-2 過量表現會將細胞膜之次花生酸代謝形成過量之前列腺素，會進而裂解產生 malondialdehyde (MDA) (Plastaras et al., 2000) ，而與 DNA 鍵結形成 M1G，此種 DNA 鍵結物和 8-hydroxyguanosine 一樣都是主要造成細胞的氧化性傷害的氧化性鹼基。同時 Cox-2 亦會將 BaP-7,8-diol 代謝形成 BPDE，進而形成 BPDE-N2-dG 鍵結物 (Sharma et al., 2001)。最近研究顯示 NF B 和 AhR

兩條細胞訊號路徑有交互作用的可能 (Kling et al., 2000), 因此推測暴露廚房油煙時會經由 NF B 和 AhR 兩條細胞訊號路徑, 促進 Cox-2 及 CYP1A1 兩種基因大量表現, 而形成大量之 BPDE-N2-dG DNA 鍵結物以及細胞之氧化性傷害。由以上結果得知, 暴露廚房油煙可能是造成台灣不抽菸女性肺癌患者產生較高量 BaP-like DNA 鍵結物的可能原因。因此 DNA 傷害較高會引起染色體之不穩定, 導致基因表現異常, 而終至引起肺腫瘤之形成。

廚房油煙及二手菸是女性最常接觸的環境污染源, 最近研究指出二手菸的成分大致和主動吸入之香菸成分相似, 但因燃燒溫度較低因此許多致癌物之濃度甚至比主動吸入之濃度高, 其細胞毒性及致突變性亦較主動吸入之香菸強, 因此二手菸之暴露與肺癌之形成有關 (Adlkofer et al., 2001)。Lee et al. (2000) 的研究中指出台灣不抽菸之女性其暴露二手菸之時間越長其罹患肺癌之危險性就越高, 若僅孩童時期暴露二手菸其罹患肺癌之危險性為從未暴露者之 1.8 倍, 但若長期暴露 (> 40 年), 則其危險性增加為 2.2 倍, 而 Johnson et al. (2001) 的研究也有相同的結果。但就不抽菸之 ³²P-postlabeling 的 DNA 鍵結物輿圖, 可發現 DNA 鍵結物輿圖與抽菸者並不相同, 因此推測二手菸之暴露, 可能沒有廚房油煙暴露, 對不抽菸之女性肺癌患者 DNA 鍵結物之形成來得重要。

流行病學的研究指出月經期短於 26 天之女性較易罹患肺癌, 這顯示血液含有低濃度之雌性素 (estrodiole ; E2) 和肺癌形成可能有關 (Gao et al., 1987)。雌性素與雌性素受體結合後其蛋白結構會發生改變, 進而發生 homodimerization, 並由細胞質進入細胞核 (Tsai et al., 1994), 進而調控雌性素受體路徑之下游基因如: c-jun (Salim et al., 1996)、c-fos (Hyder et al., 1994) bcl-2 (Bhargava et al., 1995) 及 SP2 (Rajah et al., 1996) 等的轉錄活化作用。過去的研究指出當外來之致癌物如: TCDD 進入細胞後會與 AhR

(aryl hydrocarbone receptor) 結合而抑制由雌性素所誘發之下游基因的表現 (Duan et al., 1999)。Klinge et al. (2000) 發現某些 orphan receptor 及一些 coactivator、corepressor 會調控雌性素受體及 AhR 的交互作用。而本研究中所分析之婦女大多屬已停經之年齡，因此體內之雌性素濃度可能都相對較低，因而改變 ER 及 AhR 之間的交互作用，導致 AhR 路徑被活化，而誘發 CYP1A1 mRNA 的轉錄活化，最後產生較高之 DNA 鍵結物之含量。以上機轉之推測，可由女性肺癌患者有較高之 CYP1A1 mRNA 表現量而得到佐證。

當外來之毒物進入細胞後會活化 AhR 路徑而調控 CYP1A1、GST 或 quinone oxidoreductase 等基因的轉錄作用 (Nebert et al., 2000)，此路徑已敘述於文獻綜論中。本研究室過去以免疫組織化學染色分析肺癌患者肺組織中之 AhR 及 CYP1A1 的蛋白表現，發現女性肺癌患者肺組織中的 AhR 及 CYP1A1 蛋白表現量高於男性。另外，分析 53 位不抽菸肺癌病患之非腫瘤肺組織及 20 位非癌症病患肺組織中 CYP1A1 mRNA 表現與 DNA 鍵結物的相關性，結果發現 CYP1A1 mRNA 表現量和 DNA 鍵結物含量有顯著之相關性 ($r = 0.338$; $P = 0.003$; Lai et al. unpublished data)。因此女性肺癌患者肺組織中之 DNA 鍵結物含量較高，可能與 AhR 路徑被活化有重要的關係，至於其中的作用機轉則正在研究中。

5.3. 肺癌患者 HPV 感染之可能途徑

過去已有許多肺癌與 HPV 感染相關性的研究，例如美國、法國及一些歐洲國家的研究均指出，肺癌患者肺腫瘤組織中的 HPV 感染率相當低，甚至幾乎沒有發現 HPV 的感染 (Maisko et al., 2001 ; Clavel et al., 2000 ; Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992; Thomas et al.,1995)。但在挪威卻

在 Cervical intraepithelial neoplasia 第三期之患者 (CIN III) 後來罹患肺癌之患者中，有 49.0% 的患者有 HPV 的感染，中國大陸北京的肺癌患者有 50% 的 HPV 感染；日本琉球肺癌患者肺組織中之 HPV 感染率竟高達 80%，但在日本本島的感染率卻相當低，幾乎沒有發現 (Iwamasa et al., 2000)。挪威及日本的研究有高 HPV 感染率之發現，肺腫瘤組織中可以測到 HPV DNA，有 80% 患者有子宮頸病變的病史，因此這兩個國家之肺腫瘤組織中的 HPV，很可能來自子宮頸感染，然後經血液循環感染至肺部。本研究發現 HPV 16 及 HPV 18 在肺腫瘤組織中之感染率，雖高達 35.5% 及 41.1%，但大部分不具子宮頸病變之病史，因此台灣肺癌患者之 HPV 感染途徑則需進一步深入探討。

過去許多流行病學的研究均指出，高危險型 HPV 是藉由性行為傳染 (Thomas et al., 2001 ; Kjaer et al., 2001 ; Buchanan et al., 2001)。Richard et al. (2000) 分析高危險型及低危險型 HPV 在學生族群之感染途徑時發現，高危險型 HPV 之感染與性行為有關，但低危險型 HPV 卻沒有相關。Thomas et al. (2001) 發現從事性工作之女性有較高之高危險型 HPV 感染率。由於本研究之肺癌患者全部都是已婚者，因此肺癌患者感染高危險型 HPV 16/18 是經由性行為感染，可能是合理的推測。

近幾年之研究發現，HPV 感染除了和子宮頸癌有關之外，HPV 亦和其他許多人類癌症有關。例如頭頸癌、喉癌、食道癌和結直腸癌等。頭頸癌患者的非腫瘤組織中 HPV 的感染率在 18.5-35.9% 範圍，但在腫瘤組織中之感染率則可達 34.5% (416/1205)，高危險型 HPV 16/18 頭頸癌之感染率分別為 40.0% 和 11.9%。在所有頭頸癌中，以口腔癌患者之 HPV 感染率最高，可高達 59%，其次是咽頭癌 43.0%，而喉癌則較低，僅有 33.0%。在正常人之口腔中 HPV 的感染率由 1 - 60% 不等 (Mckay et al., 1998)。因此肺腫瘤組織中之 HPV 有可能來自於口腔或呼吸道之感染。另外，

Olatunbosun et al. (2001)的研究發現，曾經或現在正感染 HPV 者有 53% (24/45) 可在其精子中測到 HPV DNA 的存在，而沒有感染 HPV 之控制組之精子中 HPV 的感染率也有 8%。美國的一個研究發現未滿 20 歲的孩童口腔黏膜細胞中 HPV 的感染會因年齡不同而有不同，年齡小於 7 歲之孩童的感染率為 8.7%，7-13 歲的孩童感染率為 0%，而 13-20 歲則有 5.2% 的感染率。而這些 HPV 的感染與性別、種族都沒有相關。又發現 13-20 歲之青少年族群中 HPV 的感染率與抽菸及性行為亦無相關。因此青少年之 HPV 可能來自在生產過程中由母親感染給嬰兒的垂直性感染途徑 (Summersgill et al. 2001)。本研究室利用正常人及肺癌患者之周邊淋巴球進行 HPV 16 及 HPV 18 的分析，結果除了肺癌患者外，健康之正常人的周邊白血球中亦可測到 HPV DNA 的存在。而 Hennig et al. (1999) 分析 75 位支氣管肺癌患者肺腫瘤組織中 HPV DNA 的感染情形，發現感染率可高達 49% (37/75)，而 37 位有 HPV 感染之肺癌患者中，有 34 位有子宮頸病變的病史，且其子宮頸 HPV 感染率為 74% (25/34)，因此推測支氣管肺癌患者肺腫瘤組織中的 HPV 可能來自於子宮頸的感染，而藉由血液循環到肺臟。而本研究之肺癌患者大部分都沒有子宮頸病變之病史，且由 ISH 的研究結果亦發現，肺腫瘤組織切片上的血球中可以測到 HPV DNA 的存在 (Fig. 13)。在本研究室目前的研究結果發現，在肺癌患者之周邊白血球中可測到 HPV DNA 的存在，其感染率分別為 HPV 16 47.4%，HPV 18 32.12% (n=137)。又發現 20 個肺癌患者之肺腫瘤組織有 HPV 16 感染的，有 12 個患者血液中有 HPV 16 的感染，其共同感染率高達 60% (12/20)。相反的若肺腫瘤組織中沒有 HPV 16 感染的，有高達 69% (27/39) 血液沒有 HPV 16 的感染。因此肺癌患者之周邊白血球和肺腫瘤組織中 HPV 16 的感染具有統計上之顯著相關 (P = 0.031)。在 HPV 18 亦發現相同的結果 (Chiou et al., unpublished data)。因此推測肺癌患者腫瘤組織中的 HPV 16/18，可能來自性行為、垂直感染或口腔及呼吸道之感染，

而藉由血液感染到肺臟。

由本研究的結果得知肺癌患者環境致癌物暴露產生較高之 DNA 鍵結物，過去有研究指出暴露致癌物會造成免疫能力的改變，Rodriguze et al. (1999) 的研究指出，暴露致癌物 BaP 會抑制 T 淋巴球的表現而抑制免疫反應。亦有研究指出 PAHs 暴露量較高之工人之血液 IgM、IgA 及 IgG 的濃度顯著低於 PAHs 濃度低者，因此暴露 PAHs 污染染物會影響免疫能力 (Szczekilk et al., 1994)。Hardin et al. (1992) 研究發現 BaP 會抑制 B 淋巴球的生成，並使未成熟 B 淋巴球的程序性死亡。由以上研究之結果都顯示，暴露環境致癌物會使個體的免疫能力降低，使個體容易遭受病毒或細菌的感染。因此推測台灣女性肺癌患者對環境致癌物易感性，引起較高之 DNA 傷害，可能會造成免疫力降低。這或許能用來解釋為何台灣女性肺癌患者有較高之 HPV 感染之原因之一。

過去有關 HPV 之分析大多以 nested-PCR, in situ hybridization、及 Southern blot 等方法偵測。由於不同實驗方法之敏感度有些不同，因此所測得的感染率的差異可能來自不同的實驗方法。本研究以 nested-PCR 及 ISH 兩種方法偵測肺腫瘤組織中 HPV16 及 HPV18 的感染率，兩種方法具有很好的一致性 (HPV 16 : 73.3% ; HPV 18 : 85.8%)。為了避免 Nested-PCR 方法過於敏感而產生的偽陽性，進一步將 PCR 分析所得的產物以自動定序儀定序，以確認所得之 PCR 產物是否就是所要偵測之 HPV DNA 片段。為了確認 PCR 放大時所用引子的專一性，又利用 SiHa 細胞 (HPV 16 positive) DNA 為模板，以 HPV18 引子進行 PCR 放大，並以 HeLa 細胞 (HPV 18 positive) DNA 為模板，以 HPV 16 引子進行 PCR 放大，HPV 6 及 HPV 11 則分別已構築好之載體為模板，結果均無法得到 PCR 產物，這結果顯示各引子對不同形式之 HPV 具有專一性 (type specific)。因此進一步證實 HPV DNA 確實存在於肺腫瘤組織中，且感染

形式以 HPV6、HPV16 及 HPV18 為主。

5.4. HPV 與腫瘤形式及腫瘤期別之相關性

過去在子宮頸癌的研究中發現 80% 以上的鱗狀上皮細胞癌有 HPV 感染，在腺細胞癌中也有 50% 的感染率 (Nagai et al., 2001 ; Iwamasa et al., 2001 ; Hirayasu et al., 1996 ; Madeleine et al., 2001)。而在肺癌的研究中亦發現肺鱗狀上皮細胞癌組織中有高達 79% 的患者有 HPV 的感染 (Hirayasu et al., 1996) , 但 Miyagi et al. (2000) 的研究指出 HPV 在肺鱗狀上皮細胞癌的感染率有逐年下降的趨勢，由 1993 年的 79% 下降至 1998 年的 24%。有研究報告指出在肺腺癌中也可以測到 HPV DNA 的存在，且感染率與肺鱗狀上皮細胞癌相當接近 (肺腺癌, 9%; 肺鱗狀上皮細胞癌, 10%) (Kinoshita et al., 1995) , Thomas 等人的研究結果發現在腺細胞癌及鱗狀上皮癌混合的肺癌患者 HPV 的感染率高達 78.3% , 且在其鄰近之腺癌細胞及鱗狀上皮癌細胞均可測到 HPV (Tsuhaiko et al., 1998)。而本研究發現在肺腺癌患者之腫瘤組織中，可以測到 HPV 16/18 DNA 且其感染率分別為 43.4% 和 49.4%。比過去之研究結果有較高之感染率，這可能是由於肺腫瘤組織中可以測到 HPV 感染者大部分是女性患者，而這些女性肺癌患者中有超過 80% 是肺腺癌所致。

在本研究結果中發現 HPV 6 及 HPV 16 的感染都與腫瘤期別有些相關。HPV 6 所轉譯出的 E6 及 E7 蛋白使細胞轉形的能力較高危險型 HPV (High-risk HPV) 低。而 HPV 6 大部分與良性瘤之產生較有關，但有研究指出 HPV 6 noncoding region 的序列若發生變異，會增加致腫瘤之能力。這可能是由於它會促進 E6 及 E7 蛋白的致癌性所致 (Grassmann et al., 1996) , 最近的研究指出，當血液中僅測到 HPV 16 而無 HPV 6/11 者，罹

患子宮頸鱗狀上皮癌的危險性是測不到者的 5.5 倍。若僅有 HPV 6/11 而無 HPV 16 者，其危險性也比測不到者高 2.2 倍 (Luostarinen et al., 1999)。因此 HPV 6 可能具有致腫瘤之能力，本研究分析結果發現，HPV 6 的感染情形與腫瘤期別有關，第一期之肺癌患者有最高的感染率，因此推測 HPV 6 感染可能參與肺腫瘤起始期之發展。而在 HPV 16 也有類似的結果，但 HPV 16 之第三期肺癌患者的感染率亦有顯著增高的趨勢，這可能與肺癌末期之免疫力下降有關，晚期之肺癌患者在治療時除手術外常合併化學治療，而這些抗癌藥劑亦會使細胞之免疫力下降，因此有可能增加 HPV 的感染 (Neuner et al., 2001 ; Woo et al., 2001)。

過去有研究指出香菸成分可能會累積在抽菸婦女的陰道分泌物中，使香菸中之致癌物長期刺激子宮頸，成為 HPV 的共同致病因子 (de Villier et al., 1992)。而長期抽菸亦會造成呼吸道及肺臟的慢性病變。又有研究指出抽菸之鱗狀上皮細胞癌患者之肺腫瘤組織中，有較高的 HPV 6/11 感染率 (Xing et al., 1993, 1994)。而過去的研究發現幾乎大部分的呼吸道良性瘤的組織中皆可測到 HPV 6 及 HPV 11 (Shah et al., 1992)。Steinberg et al. (1990) 指出 HPV 6/11 與上呼吸道腫瘤的形成有關。而本研究中同樣發現抽菸之肺癌患者有較高之 HPV 6 的感染率，因此推測抽菸者之肺癌患者肺腫瘤組織中之 HPV 6 可能來自於呼吸道感染。

5.5. HPV E6 與肺腫瘤組織中 p53 蛋白之降解或去活化之相關性

過去以腫瘤組織之材料來探討人類癌症與 HPV 感染之相關性，大多著重於 HPV 之 DNA 層次。HPV 致癌蛋白 E6 與 p53 及 E7 與 Rb 之間的相關性研究則多在子宮頸癌細胞株中進行，而直接在腫瘤組織研究其相關性之研究報告並不多。且大部分方法是以直接抽取組織之 RNA 進行 RT-PCR

分析 E6 及 E7 mRNA 的表現 (Selinka et al., 1998), 或是以 RNA-RNA 原位雜交實驗 (ISH) 直接以 RNA 為探針去偵測 HPV E6 及 E7 的表現 (Milde-Langosch et al., 2001 ; Riethdraf et al., 1998 ; Wilczynski et al., 1998), 或直接以免疫組織化學染色法 (IHC) 分析 E6 及 E7 蛋白的表現 (Pillai et al. 1998)。但 ISH 及 IHC 之分析方法的敏感度較差, 而直接萃取組織之 RNA 進行 RT-PCR 分析, 雖具有較高之敏感性, 但有非腫瘤組織的干擾, 有可能造成實驗之偽陽性反應。因此本研究以連續病理切片直接以 *in situ* RT-PCR 和 IHC 方法同時分析在相同之腫瘤組織細胞中, E6 與 p53 及 E7 與 Rb 之間的相關性, 可以更清楚的了解在同一個腫瘤細胞中 E6 與 p53 及 E7 與 Rb 之間的相關性。但以福馬林固定石蠟包埋之肺腫瘤組織切片進行 *in situ* RT-PCR 之反應, 有可能造成 RNA 的降解而低估了 HPV E6 及 E7 的表現率。這或許可以用來解釋為何有一半以上之肺癌患者有 P53 和 Rb 蛋白不表現, 但又無法以 HPV E6 和 E7 mRNA 的表現來解釋。

高危險型 HPV E6 對 p53 的降解作用主要是透過 E6 association protein (E6AP), 其主要功能是 E6AP 會先與 E6 結合, p53 才會與 E6 蛋白的 p53 binding domain 結合, 而透過 ubiquitin 調控路徑降解 P53 蛋白 (Huibregtse et al., 1991, 1993; Scheffner et al., 1993)。我們初步以免疫組織化學染色分析肺腫瘤組織中 E6AP 蛋白之表現的結果發現, 肺腫瘤組織中 E6AP 的表現率高達 80% (111/137) (Cheng et al., unpublished data)。由此推測 HPV16/18 E6 可能參與了肺腫瘤組織中 P53 蛋白的降解。

由以上結果得知, HPV 16/18 之 E6 與 p53 蛋白不表現有相關性。但在 Table 32 卻發現有四位肺癌患者肺腫瘤組織中可以測到 HPV 16E6 但同時亦有 p53 蛋白表現, 而在 p53 基因突變的分析上, 這些患者之 p53 基因

並沒有發生突變。而在 HPV 18 的分析中也有八位患者有同樣情形，似乎都不合乎現有理論來解釋。但由一些研究得知，HPV E6 除了造成 p53 的降解外，還會透過其他的調控路徑，而使細胞週期失控 (Fiamma 1999)。即 HPV E6 會與 p53 蛋白之 C 端結合而抑制 p53 蛋白所調控的轉錄作用，p53 蛋白所轉錄活化的 p21^{CIP} (CDK inhibitor protein)，具有抑制 cyclin/cdk 複合體活性的能力，進而抑制細胞週期的進行，因此當 p53 蛋白所調控的轉錄作用被抑制，細胞週期便會失去控制 (Li et al., 1996 ; Lechner et al., 1996)。當 HPV E6 基因發生突變，通常會使其降解 p53 蛋白的能力降低，但此 HPV E6 突變蛋白仍會與 p53 結合，並抑制 p53 蛋白所調控的轉錄作用 (Pim et al., 1994)。因此 HPV E6 並不一定要透過降解 p53 蛋白，而使其無法控制細胞週期造成癌化，亦可經抑制其所調控的轉錄作用而達到此目的。此外，HPV E6 亦可與 p53 蛋白之輔活化因子 (coactivator) p300/CBP 結合，而抑制 p53 蛋白的轉錄調控作用 (Zimmermann et al., 1999)。過去有研究指出 p300 具有促使 MDM2 降解 p53 蛋白的能力 (Grossman et al., 1998)，而當 p300 與腺病毒之 E1A 蛋白結合時便會使 p300 失去功能，因此抑制 p300 促使 MDM2 降解 P53 蛋白的能力，而增加 p53 蛋白之穩定性，但因 p300 失去功能，因此 p53 也失去其轉錄活化的能力 (Lowe et al., 1993 ; Querido et al., 1997 ; Chiou et al., 1997)。因此推測當 HPV E6 與 p300/CBP 結合時，可能會抑制 p53 蛋白之轉錄活化能力。這可能可以用來解釋為何 HPV E6 存在，且 p53 基因沒有發生突變，但 p53 蛋白卻不會被 E6 降解的原因。

5.6. HPV E7 與 Rb 蛋白之去活化

由本研究之結果發現 HPV 16/18 E7 的表現可解釋部分肺腫瘤組織中之 Rb 之去活化，但兩者間的關係並非如此單純。就目前已知的研究，E7 造成

Rb 蛋白去活化的調控路徑，有四個主要路徑：(一) E7 與低度磷酸化之 Rb 結合而達到使細胞轉形的作用 (Paggi et al., 1996)。(二) HPV 16 E7 具有轉錄活化 cdc25A 的能力，因而促使 CDK2 的去磷酸化而活化 cyclinA/CDK2 複合體，又活化之 cyclinA/CDK2 複合體具有將 Rb 磷酸化的能力，因而將 E2F 釋放出來，使細胞週期由 G1 進入 S 期 (Katich et al., 2001)。(三) 高危險型 E7 蛋白可以促進 cyclin A 及 cyclin E 的產生及活化 cdk2 kinase，而促進 Rb 的磷酸化 (Zerfass-Thome et al., 1996; Jones et al., 1997; Funk et al., 1997; Martin et al., 1998)。(四) 藉由與 p21^{CIP} 及 p27 結合而抑制其活性，使其無法抑制 CyclinA/CDK2 複合體的活性進而使 Rb 磷酸化 (Zerfass-Thome et al., 1996; Jones et al., 1997; Funk et al., 1997)。以上不論是經由那一種調控路徑，高危險型 HPV 所轉錄出的 E7 都具有 Rb 去活化的能力，而使細胞週期失去控制，進而發生腫瘤化，但由本研究僅有 Rb 蛋白表現與 HPV 16/18 E7 mRNA 之結果，無法得知 HPV 16/18 E7 對肺腫瘤組織中 Rb 蛋白之去活化的過程是經由那一種路徑。這仍需要收集不同癌化程度的肺腫瘤組織，進行相關基因的表現與 Rb 蛋白之磷酸化程度之相關性研究，才能進一步的了解 HPV E7 是經由何種路徑造成 Rb 去活化。另外，Rb 蛋白去活化後會釋放出 E2F，而 E2F 會轉錄活化 p16^{INK4a} 的表現，因此在許多 HPV 感染之子宮頸癌的研究中，均發現 HPV 感染之腫瘤組織中，P16 蛋白的表現反而高於沒有 HPV 感染之腫瘤組織 (Milde-Langosch et al., 2001; Klaes et al., 2001)。Giarre et al. (2001) 的研究指出，高危險型 HPV 所轉錄出來的 E7 會使 Rb 去活化，因此細胞週期進行之能力反而超過 P16 抑制細胞週期之能力。這或許能用來解釋為何肺腫瘤組織中 Rb 蛋白去活化，但 P16 蛋白又表現之肺腫瘤形成的可能機轉。

5.7. p53 codon 72 基因多型性與 HPV 之相關性

在子宮頸癌的研究中指出感染 HPV 後，若其 p53 codon72 之基因型為 Arg/Arg 者，罹患子宮頸癌的危險性較 Arg/Pro 及 Pro/Pro 者高 (Dokianaki et al., 2000 ; Andersson et al., 2001)。但有許多研究卻看不到兩者間的相關性。例如 Minaguchi et al. (1998) 的研究中發現，p53 codon72 之基因型為 Arg/Arg 者並不會增加罹患子宮頸癌之危險性，而在其他與 HPV 有關之癌症也看不到兩者間的相關性 (O'Connor et al., 2001 ; Peixoto et al., 2001 ; Hame et al., 2000 ; Wang et al., 1999)。Zehbe et al. (1999) 認為得到不同結果之原因，可能是由於所分析的族群中，p53 基因 codon 72 的三種基因型之族群分布不同所致。Makni et al. (2000) 的研究結果指出，實驗方法之敏感性及分析所用的統計方式也會影響分析之結果。而在本研究之分析結果，僅 HPV 18 的感染與 p53 codon72 之基因多形性有關，或許有可能是分析族群分布不均所致。另外，p53 codon 72 的基因多形性會影響 E6 降解 p53 的能力，Arg/Arg 對 E6 的易感性是 Arg/Pro 的 7 倍 (Storey et al., 1998)。van Duin et al. (2000) 研究指出 HPV 16E6 350 G T 的突變，會影響降解 P53 蛋白的能力。p53 codon72 之基因型為 Arg/Arg 且 HPV 16 350 為 T 者，罹患子宮頸癌之機率較其他基因型者高。但本研究結果卻沒有發現 HPV 16 及 HPV 18 和降解 p53 蛋白與 p53 codon72 之基因多形性之間的相關性。因此 HPV E6 參與肺腫瘤組織中 p53 蛋白之降解之相關性，不是因為 p53 基因的多形性所致。然而是否台灣肺癌患者有 E6 基因的突變發生，而造成兩者間沒有相關性，則需進一步的研究。

5.8. HPV 感染與肺癌患者預後之相關性

HPV 感染是否會影響癌症患者之預後，至今研究結果分歧。Iwamasa et al. (2000) 的研究指出，肺腫瘤組織中有 HPV 感染且病理組織切片中的 Langerhans 細胞表現量較高之肺癌患者的預後會比沒有感染 HPV 之肺癌患者好。同時亦發現 HPV 感染之肺癌患者肺腫瘤組織的分化情況較好。這或許是導致 HPV 感染之肺癌患者有較好之預後的原因之一。Miyang et al. (2001) 亦發現相同的結果。在口腔癌的研究發現，HPV16 感染之口腔癌患者有較高的存活率 (Schwartz et al., 2001)。在扁桃腺癌患者之腫瘤組織中，若測到 HPV DNA 的表現者，三年存活率為 65.3%，顯著高於沒有 HPV 感染之患者 (31.5%)，而五年存活率也較長 (53.5% vs 31.5%) (Mellin et al., 2000)。Benzerra et al. (2001) 研究發現，HPV 感染與陰莖癌患者之預後無關。Lo et al. (2001) 的研究指出，HPV18 感染之子宮頸癌患者預後，較沒有感染 HPV 之患者差，但 HPV16 之感染則與預後無關。Schwartz et al. (2001) 亦發現相同的結果。以上研究結果不一致可能是由於 HPV 感染後不一定會嵌入宿主之 DNA 產生致癌蛋白，而對細胞的影響較小。本研究在肺癌患者肺腫瘤組織中發現 HPV16 E6/E7 表現且 p53/Rb 去活化者，其預後較 HPV 16 E6/E7 不表現者差 (P=0.0817 ; Table 34)。HPV 16/18 E6/E7 mRNA 表現與 p53 及 Rb 蛋白的降解或去活化有關之結果，似乎可由 HPV 16 E6/E7 表現且 p53/Rb 去活化者之預後較差得到支持。

綜合以上結果推測 HPV 可能參與了肺癌之形成。但仍需要更多的實驗數據來支持。除了 E6 及 E7 這兩個致癌蛋白外，HPV 鑲嵌至宿主的 DNA 中常會造成宿主細胞基因的不穩定性，亦是造成細胞的腫瘤化的重要機轉，而 HPV 病毒鑲嵌到宿主細胞的位置目前並不清楚。最近本

研究室已全力進行有關 HPV DNA 鑲嵌至肺腫瘤細胞之位置，並與子宮頸癌之 HPV DNA 鑲嵌染色體輿圖做一比較，以了解 HPV 是否確實參與肺腫瘤之形成，以及了解 HPV DNA 嵌入肺細胞染色體與肺癌腫瘤化之相關性。同時也將以初代培養技術建立有 HPV 感染及沒有 HPV 感染之肺癌細胞株，並利用所建立之細胞株進行生物晶片分析，並將此分析結果與 HPV 感染和不感染之肺腫瘤組織的基因表現輿圖做一分析比較，以找出 HPV 參與肺癌腫瘤化之特異基因。總之，由 HPV 感染與肺癌的研究，將有助於了解 HPV 引起人類癌症之重要致癌機轉，並進而將來找出預防和治療 HPV 引起之人類癌症之有效方法。

6. 參考文獻

- Adlkofer F. Lung cancer due to passive smoking-a review. *Int Arch Occup Environ. Health*, 74: 231-241, 2001.
- Alexandrov K, Rojas M, Geneste O, Castegnaro M, Camus AM, Petruzzelli S, Giuntini C, and Bartsch H. An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparison with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, 52: 6248-6253, 1992
- Andersson S, Rylander, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, and Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur. J. Cancer*, 37(2):246-50, 2001.
- Annual Report of Tobacco. Alcohol Consumption Investigation in Taiwan Area. Taipei, Taiwan, Bureau of Tobacco and Alcohol Monopoly. Taiwan Provincial Government, 1993.
- Anttila S, Tuominen P, Hirvonen A, Nurminen M, Karjalainen A, Hankinson O, and Elovaara E. CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics*, 11(6): 501-9, 2001.
- Band V, Zajchowski D, Kulesa V, and Sager R. Human papillomavirus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 87(1): 463-7, 1990.
- Banks L, Barnett SC, and Crook T. HPV-16 E7 functions at the G1 to S phase transition in the cell cycle. *Oncogene*, 5 (6): 833-7, 1990.
- Bartsch H, Rojas M, Alexandrov K, Camus AM, Castegnaro M, Malaveille C, Anttila, S, Hirvonen K, Husgafvel-Pursiainen K, Hietanen E, and Vainio H. Metabolic polymorphism affecting DNA binding and excretion of carcinogens in human. *Pharmacogenetics*, 5: S84-S90, 1995.
- Bartsch H, and Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ. Health. Perspect.*, 104: 569-577, 1996.
- Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vahakangas KH, Castren K, Welsh JA, Bowman ED, Khan MA, Flieder DB, and Harris CC. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J. Nat. Cancer Inst.*, 91(23):2009-14, 1999.
- Betticher DC, White GR, Vonlanthen S, Liu X, Kappeler A, Altermatt HJ, Thatcher N, and Heighway J. G1 control gene status is frequently altered in resectable

- non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 74(5): 556-62, 1997
- Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR. And Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*, 91(12): 2315-21, 2001.
- Blom JM, Tamarkin L, Shiber JR, and Nelson RJ. Learned immunosuppression is associated with an increased risk of chemically-induced tumors. *Neuroimmunomodulation*, 2(2): 92-9, 1995.
- Bohlmeier T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, and Shroyer KR. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction. *Am. J. Respir. Cell & Mol. Bio.*, 18(2): 265-9, 1998.
- Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49(17):4682-9, 1989.
- Bouvard V, Storey A, Pim D, and Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO*, 13(22): 5451-9, 1994.
- .Buchanan J. and Niel-Fisher NS. Role of immune function in human papillomavirus infection. *JAMA*, 286(10):1173-4, 2001.
- Cagle PT, el-Naggar AK, Xu HJ, Hu SX, and Benedict WF. Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.*, 150(2):393-400, 1997.
- Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, and Sidransky D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science*, 265 (5170): 415-7, 1994.
- Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, and Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ. Health Perspect.*, 93:125-31, 1991.
- Cavalieri EL, and Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol. Ther.*, 55(2): 183-99, 1992.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, and Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.*, 69: 3074-83, 1995.
- Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, and Chen SL. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J. Biomed. Science*, 8(2):206-13, 2001.
- Chen CC, and Lee H. Genotoxicity and DNA adduct formation of incense smoke condensates: comparison with environmental tobacco smoke condensates. *Mutation Res.*, 367(3):105-14, 1996.

- Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, Chen KW, Chen SG, Lai GM, Huang HH, and Lee HH. Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res*, 10: 971-976, 1990.
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, and Wei Q. Reduced DNA capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 7:465-468, 1998.
- Chen S, Xue K, Xu L, Ma G, and Wu J. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in Chinese population. *Mutation Res.*, 458(1-2):41-7, 2001.
- Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J*, 8(2):182-91, 1994.
- Clavel, CE, Nawrocki, B, Bosseaux, B, Poitevin, G, Putaud, IC, Mangeonjean, CC, Monteau, M, and Birembaut, PL. (2000) Detection of human papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by hybrid capture II: a study of 185 tumors. *Cancer*, 88, 1347-1352.
- Claudio PP. Immunohistochemical investigation of new suppressor oncogene p130 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 36(5):497, 2000.
- Claudio PP, Howard CM, Fu Y, Cinti C, Califano L, Micheli P, Mercer EW, Caputi M, and Giordano A. Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 60(1):8-12, 2000
- Clemens KE, Brent R, Gyuris J, and Munger K. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology*, 214(1):289-93, 1995.
- Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 147(3): 545-60, 1995
- Da J, Chen L, and Hu Y. Human papillomavirus infection and p53 gene mutation in primary lung cancer. *Chung-Hau Chung Liu Tsa Chih*, 18(1), 27-29, 1996.
- de Villiers EM. Hybridization methods other than PCR: an update. IARC Scientific Publications (Lyon). (119):111-9, 1992.
- Deng J. The prevalence of the cigarette smoking habit among 110,000 adult residents in the Shanghai urban area. *Chung-Hua Yu Fang i Hsueh Tsa Chih* 19(5):271-4, 1985.
- Devesa SS, Blot WJ, and Fraumeni JF. Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. *J. Nat. Cancer Inst.*, 81(20):1568-71, 1989.
- Dipple A, Pigott MA, Agarwal SK, Yagi H, Sayer JM, and Jerina DM. Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature*, 327(6122): 535-6, 1987.

- Decoufle P. Further analysis of cancer mortality patterns among workers exposed to cutting oil mists. *J. Nat. Cancer Inst.*, 61(4):1025-30, 1978.
- Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated cervical cancer. *Mol. Cell Biol. Res. Comm.*, 3(2):111-4, 2000.
- Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, and Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J.*, 5(2): 355-62, 1986.
- Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, and Crawford L. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology*, 178(1): 254-62, 1990.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, and Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352(6338): 824-7, 1991.
- Duan R, Porter W, Samudio I, Vyhlidal C, Kladd M, and Safe S. Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol. Endocrinol.*, 13(9):1511-21, 1999.
- Dubrow R, and Wegman DH. Cancer and occupation in Massachusetts: a death certificate study. *Am. J. Indus. Med.*, 6(3):207-30, 1984.
- Dunn BP, Vedal S, San RHC, Kwan WF, Nelems B, Enarson DA, Stich HF. DNA adducts in bronchial biopsies. *Int J Cancer*, 48, 485-492, 1991.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, and Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.*, 11(16):2090-100, 1997.
- Galli J, d'Ecclesia A, La Rocca LM, and Almadori G. Giant schwannoma of external auditory canal: a case report. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 124(4):473-4, 2001.
- Gao YT, Blot WJ, Zheng W, Ershow AG, Hsu CW, Levin LI, Zhang R, and Fraumeni Jr JF. Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer*, 40:604-609, 1987.
- Gao YT. Risk factors for lung cancer among women nonsmokers with emphasis on lifestyle factors. *Lung Cancer*, 14: S39-S45, 1996.
- Garcia-Closas M, Kelsey KT, Wiencke JK, Xu X, Wain JC, and Christiani DC. A case-control study of cytochrome P4501A1 glutathione S-transferase M1, cigarette smoking and lung cancer susceptibility. *Cancer Cause Control*, 8: 544-553, 1997.
- Giarre M, Dousse B, and Meister JJ. Velocity vector reconstruction for color flow

- Doppler: experimental evaluation of a new geometrical method. *Ultrasound in Med. Bio.*, 22(1):75-88, 1996.
- Geneste O, Camus AM, Castegnaro M, Petruzzelli S, Macchiarini P, Angeletti CA, Giuntini C, Bartsch H. Comparison of pulmonary DNA adduct levels, measured by ³²P-postlabelling and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lung parenchyma of smokers and ex-smokers. *Carcinogenesis*, 12(7):1301-5, 1991.
- Ger LP, Liou SH, and Shen CY. Risk factor of lung cancer. *J. Formosan Med. Assoc.*, 91: S222-S231, 1992.
- Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, and Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J. Virol.*, 75(10):4705-12, 2001.
- Godschalk RW, Dallinga JW, Wikman H, Risch A, Kleinjans JC, Bartsch H, and van Schooten FJ. Modulation of DNA and protein adducts in smokers by genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1, NAT1 and NAT2. *Pharmacogenetics*, 11(5):389-98, 2001.
- Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, and Kittas C. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum. Pathol.*, 30(3):274-83, 1999.
- Grassmann K, Wilczynski SP, Cook N, Rapp B, and Iftner T. HPV6 variants from malignant tumors with sequence alterations in the regulatory region do not reveal differences in the activities of the oncogene promoters but do contain amino acid exchanges in the E6 and E7 proteins. *Virology*, 223(1):185-97, 1996.
- Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ, and Poiesz BJ. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 17(2):668-75, 1999.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54(18):4855-78, 1994.
- Groppi A, Couttele C, Fleury B, Iron A, Beugeret J, and Couzigous P. Glutathione S-transferase class mu in French alcoholic cirrhotic patients. *Hum. Genet.*, 87: 628-630, 1991.
- Gsur A, Haidinger G, Hollaus P, Herbacek I, Madersbacher S, Trieb K, Pridun N, Mohn-Staudner A, Vetter N, Vutuc C, and Micksche M. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 and lung cancer risk. *Anticancer Res.*, 21(3C):2237-42, 2001.

- Guinee Jr DG, Travis WD, Trivers GE, De Benedetti V MG, Cawley H, Weish JA, Bennett WP, Jett J, Colby TV, Tazellaar H, Abbondanzo SL, Pairolero P, Trastek V, Caporaxo NE, Liotta LA, and Harris CC. Gender comparisons in human lung cancer: analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and C-erb B-2 expression. *Carcinogenesis*, 16:993-1002, 1995.
- Gupta RC. Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.*, 45: 5656-5662, 1985.
- Gupta RC, and And Earley K. 32P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis*, 9(9):1687-93, 1988.
- Hall M, Parker DK, Grover PL, Lu JY, Hopkins NE, and Alworth WL. Effects of 1-ethynylpyrene and related inhibitors of P450 isozymes upon benzo[a]pyrene metabolism by liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 76(2):181-92, 1990.
- Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, and Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*, 241(4863):353-7, 1988.
- Hardin JA, Hinoshita F, and Sherr DH. Mechanisms by which benzo[a]pyrene, an environmental carcinogen, suppresses B cell lymphopoiesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 117(2):155-64, 1992.
- Harvey JC, and Beattie EJ. Lung cancer. *Clinical Symposia*. 45(3):1-32, 1993.
- Harris CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, 104:435-9, 1996.
- Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Finder AN, Brown T, Borysiewicz LK, and Gelder CM. Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J. Clin. Microbiol*, 39(9): 3204-12, 2001.
- Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, and Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J. Biochem.*, 110: 407-411, 1991.
- Helt AM, and Galloway DA. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J. Virol.*, 75(15):6737-47, 2001.
- Hemminki K. DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis*, 14(10):2007-12, 1993.
- Hennig EM, Suo Z, Karlsen F, Holm R, Thoresen S, and Nesland JM. HPV positive bronchopulmonary carcinomas in women with previous high-grade cervical

- intraepithelial neoplasia (CIN III). *Acta. Oncologica.*, 38(5):639-47, 1999.
- Hershko A, and Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.*, 61:761-807, 1992.
- Hickman ES, Bates S, and Vousden KH. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E7. *J. Virol.*, 71(5):3710-8, 1997.
- Hirayama T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *British Medical J. Clin. Res. Ed.*. 282(6259):183-5, 1981.
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, and Genka K. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J. Clin. Pathol.*, 49(10):810-7, 1996.
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, and Genka K (1996) Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J. Clin. Pathol.*, 49, 810-817.
- Hirvonen A. Husgafvel-Pursiainen K. Anttila S. Karjalainen A. Sorsa M. Vainio H. Metabolic cytochrome P450 genotypes and assessment of individual susceptibility to lung cancer. *Pharmacogenetics*, 2(6):259-63, 1992.
- Hochstrasser M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell*, 84(6):813-5, 1996.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1986) IARC monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Tobacco Smoking, Vol 38, IARC, Lyon, France.
- Holt SE, Schuller G, and Wilson VG. DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences contained within an 18-base-pair inverted repeat element at the origin of replication. *J. Virol.*, 68(2):1094-102, 1994.
- Hong YS, Chang JH, Kwon OJ, Ham YA, and Choi JH. Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase gene in Korean lung cancer patients. *Exp. & Mol. Med.*, 30(4):192-8, 1998.
- Houlston RS. Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 8(8):675-82, 1999.
- Hou SM, Falt S, Yang K, Nyberg F, Pershagen G, Hemminki K, and Lambert B. Differential interactions between GSTM1 and NAT2 genotypes on aromatic DNA adduct level and HPRT mutant frequency in lung cancer patients and population controls. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 10(2):133-40, 2001.
- Huibregtse JM, Scheffner M, and Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J*, 10(13):4129-35, 1991.
- Huibregtse JM, Scheffner M, and Howley PM. Localization of the E6-AP regions that

- direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell. Bio.*, 13(8):4918-27, 1993.
- Hamel N, Black MJ, Ghadirian P, and Foulkes WD. No association between P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer.*, 82(4):757-9, 2000.
- Hussain SP, and Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*, 58: 4023-4037, 1998.
- Husgafvel-Pursiainen K, Hackman P, Ridanpaa M, Anttila S, Karjalainen A, Partanen T, Taikina-Aho O, Heikkila L, and Vainio H. K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Int. J. Cancer*, 53(2):250-6, 1993.
- Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, Nyberg F, Pershagen G, Mukeria A, Constantinescu V, Fortes C, and Benhamou S. p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res*, 60(11):2906-11, 2000.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, Hewer A, Phillips DH, Ryberg D, Haugen A, and Harris CC. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res*, 61(17):6350-5, 2001.
- Hwang ES, Nottoli T, and Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology*, 211(1):227-33, 1995.
- Hyder SM, and Stancel GM. In vitro interaction of uterine estrogen receptor with the estrogen response element present in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 48(1):69-79, 1994.
- Ichiba M, Hagmar L, Rannug A, Hogstedt B, Alexendrie AK, Carstensen U, and Hemminki K. Aromatic DNA adducts, micronuclei and genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 in Chimney sweeps. *Carcinogenesis*, 15, 1347-1352, 1994.
- International Agency for research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation Tobacco smoking. Vol. 38. Lyon: International Agency for research on Cancer, 1986.
- Iwamasa T, Miyagi J, Tshako K, Kinjo T, Kamada Y, Hirayasu T, and Genka K. Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Pathol. Res. Practice*, 196(4):209-18, 2000.
- Jayaraman L, and Prives C. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 55(1):76-87, 1999.

- Jassem E, Bigda J, Dziadziuszko R, Schlichtholz B, Le Roux D, Grodzki T, Rzyman W, Konopa K, Poberezna M, Dobrzanska Z, Skokowski J, Soussi T, and Jassem J. Serum p53 antibodies in small cell lung cancer: the lack of prognostic relevance. *Lung Cancer*, 31(1):17-23, 2001.
- Jeffrey AM, Jennette KW, Blobstein SH, Weinstein IB, Beland FA, Harvey RG, Kasal H, Miura I, and Nakanishi K. Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: structure of a benzo[a]pyrenetetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *J. Am. Chemical Society*, 98(18):5714-5, 1976.
- Jeffrey AM, Weinstein IB, Jennette KW, Grzeskowiak K, Nakanishi K, Harvey RG, Autrup H, and Harris C. Structures of benzo(a)pyrene--nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature*, 269(5626):348-50, 1977.
- Jentsch S, Schlenker S. Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*, 82(6):881-4, 1995.
- Jones DL, Alani RM, and Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.*, 11(16):2101-11, 1997.
- Kao YC, Korzekwa KR, Laughton CA, and Chen S. Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450. A site-directed mutagenesis study. *European J. Biochem.*, 268(2):243-51, 2001.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, and Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 51(23 Pt 1):6304-11, 1991.
- Katich SC, Zerfass-Thome K, and Hoffmann I. Regulation of the Cdc25A gene by the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. *Oncogene*, 20(5):543-50, 2001.
- Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, and Shields PG. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl Cancer Inst*, 87: 902-907, 1995.
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Hayashi S, and Watanabe J. Individual differences in lung cancer susceptibility in relation to polymorphisms of P-450IA1 gene and cigarette dose. *Princess Takamatsu Symposia*, 21:55-61, 1990.
- Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, Tanaka S, and Sugimachi K. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res*, 60(11):2753-5, 2000.
- Khaled HM, Raafat A, Mokhtar N, Zekai AR, and Gaballah H. Human papilloma virus infection and overexpression of p53 protein in bilharzial bladder cancer. *Tumori*, 87(4): 256-261, 2001.

- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, and Lavin MF. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nature Genetics*, 20(4):398-400, 1998.
- Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, Hommura F, and Kawakami Y. Altered p16INK4 and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res*, 56(24):5557-62, 1996.
- Kihara M, Kihara M, and Noda K. Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis*, 16(10):2331-6, 1995.
- Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, and Kelsey KT. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 61(8):3419-24, 2001.
- Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, and Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 10(2):101-6, 2001.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int. J. Cancer*, 92(2):276-84, 2001.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*, 65(5):227-51, 2000.
- Ko YC, Lee CH, Chen MJ, Huang CC, Chang WY, Lin HJ, Wang HZ, and Chang PY. Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan. *Int J Epidemiol*, 26: 24-31, 1997.
- Ko JL, Chang YW, Chang SL, Su JM, Chen CY and Lee H. MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 89:265-270, 2000.
- Koo LC, and Cho JH. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int J Epidemiol*, 19: S14-S23, 1990.
- Koo LC, and Ho JHC. Diet as confounder of the association between air pollution and female lung cancer: Hong Kong studies on exposures to environmental tobacco

- smoke, incense, and cooking fumes as examples. *Lung Cancer*, 14 Suppl 1: S47-S61, 1996.
- Koo LC, and Ho JH. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int. J. Epidemiol.*, 19 Suppl 1:S14-23, 1990.
- Kratzke RA, Greatens TM, Rubins JB, Maddaus MA, Niewoehner DE, Niehans GA, and Geradts J. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res*, 56(15):3415-20, 1996.
- Kriek E, Rojas M, Alexandrov K, and Bartsch H. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutation Res*, 400, 215-231, 1998.
- Kung IT, So KF, Lam TH. Lung cancer in Hong Kong Chinese: mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer*, 50(3):381-8, 1984.
- Kuo CY, Cheng YW, Chen CY, and Lee H. Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung city, Taiwan. *Environ. Res*, 78, 43-49, 1998.
- Kurakawa E, Shimamoto T, Utsumi K, Hirano T, Kato H, and Ohyashiki K. Hypermethylation of p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 19(2):277-81, 2001
- La DK, and Swenberg JA. DNA adducts: biological markers of exposure and potential application to risk assessment. *Mutation Res*, 365: 129-146, 1996.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381):15-6, 1992.
- Law H, and Day NE. Incidence rates of specific histological types of lung cancer in Singapore Chinese dialect group and their aetiological significance. *Int. J. Cancer*, 17: 304-309, 1976.
- Lee H, Su SY, Liu KS, and Chou MC. Correlation between meteorological conditions and mutagenicity of airborne particulate samples in a tropical monsoon climate area from Kaohsiung city, Taiwan. *Environ Mol Mutagen*, 23: 200-207, 1994.
- Lee H, Yur JH, Shiow SJ, and Lin JY. The mutagenic activity of smog airborne particles collected from combustion products. *J. Chin. Oncol. Soc*, 4: 1-8, 1988.
- Lee PN. "Marriage to a smoker" may not be a valid marker of exposure in studies relating environmental tobacco smoke to risk of lung cancer in Japanese non-smoking women. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 67(5):287-94, 1995.
- Le Marchand L, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF. Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res*, 58(21):4858-63, 1998.
- Lewtas J, Walsh R, Williams R, and Dobias L. Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses.

- Mutation Res, 378: 51-63, 1997.
- Li D, Wang M, Cheng L, Spitz MR, Hittelman WN, and Wei Q. In vitro induction of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer. *Cancer Res*, 56(16):3638-41, 1996.
- Li D, Firozi PF, Wang LE, Bosken CH, Spitz MR, Hong WK, and Wei Q. Sensitivity to DNA damage induced by benzo(a)pyrene diol epoxide and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Cancer Res*, 61(4):1445-50, 2001.
- Li R, Yang L, Fouts E, and Botchan MR. Site-specific DNA-binding proteins important for replication and transcription have multiple activities. *Cold Spring Harbor Symp Q Biol*, 58:403-13, 1993.
- Li X, and Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.*, 70(7):4509-16, 1996.
- Lin P, Wang SL, Wang HL, Chen KW, Lee HS, Tsai KJ, Chen CY, and Lee H. Association of CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase polymorphisms with lung squamous cell carcinoma. *Brit. J. Cancer*, 82(4): 852-857, 2000.
- Liu Q, Sasco AJ, Riboli E, Hu MX. Indoor air pollution and lung cancer in Guangzhou, People's Republic of China. *Am J Epidemiol*, 137: 145-154, 1993..
- Lin SY, Tsai SJ, Wang LH, and Lee H. Protection by quercetin against cooking oil fumes-induced DNA damage in human lung adenocarcinoma CL-3 cells: The role of Cox-2. (Submitted)
- Lofroth G, Stensman C, and Brandhorst-Satzkorn M. Indoor sources of mutagenic aerosol particulate matter: smoking, cooking and incense burning. *Mutation Res*, 261(1):21-8, 1991.
- Lobe LA, Emster VL, Warner KE, Abbotts J, and Laszol J. Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*, 44: 5940-5958, 1984.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, and Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstetrics & Gynecol.*, 79(3):328-37, 1992.
- Lo KW, Cheung TH, Yim SF, and Chung TK. Preoperative hysteroscopic assessment of cervical invasion by endometrial carcinoma: a retrospective study. *Gynecol. Oncol.*, 82(2):279-82, 2001.
- Lu X, and Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?. *Cell*, 75(4):765-78, 1993
- Lubin JH, Blot WJ, Berrino F, Flamant R, Gillis CR, Kunze M, Schmahl D, and Visco G. Patterns of lung cancer risk according to type of cigarette smoked. *Int. J. Cancer*, 33: 569-576, 1984.

- Luostarinen T, af Geijerstam V, Bjorge T, Eklund C, Hakama M, Hakulinen T, Jellum E, Koskela P, Paavonen J, Pukkala E, Schiller JT, Thoresen S, Youngman LD, Dillner J, and Lehtinen M. No excess risk of cervical carcinoma among women seropositive for both HPV16 and HPV6/11. *Int. J. Cancer*, 80(6):818-22, 1999.
- McKaig RG, Baric RS, and Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head & Neck*, 20(3):250-65, 1998.
- Madeleine MM, Daling JR, Schwartz SM, Shera K, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC, Critchlow CW, McDougall JK, Porter P, and Galloway DA. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 10(3):171-7, 2001.
- tion with high female incidence rate. *Int. J. Cancer*, 20: 850-854, 1977.
- MacLennan R, da Costa J, Day NE, Law CH, Ng YK, and Shanmugaratnam K. Risk factors for lung cancer in Singapore Chinese, a population with high female incidence rate. *Int. J. Cancer*, 20: 850-854, 1977.
- Maltzman W. Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4(9):1689-94, 1984.
- Mantovani F. Banks L. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene*. 18(22):3309-15, 1999.
- Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Carnicelli V, Tognoni V, Filardo A, Angeletti CA, and Bevilacqua G. Alterations of P16 (MTS1) in node-positive non-small cell lung carcinomas. *J. Pathol.* 181(2):178-82, 1997.
- Marshall SE, Bordea C, Wojnarowska F, Morris PJ, and Welsh KI. p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to skin cancer after renal transplantation. *Transplantation*, 69(5):994-6, 2000.
- Martin LG, Demers GW, and Galloway DA. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J. Virol*, 72(2):975-85, 1998.
- Matsuzoe D, Hideshima T, Iwasaki A, Yoneda S, Kawahara K, Shirakusa T, and Kimura A. Glutathione S-transferase mu1 null genotype is associated with K-ras gene mutation in lung adenocarcinoma among smokers. *Carcinogenesis*, 22(8):1327-30, 2001.
- Mayne ST, Buenconsejo J, and Janerich DT. Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am. J. Epidemiol.*, 149(1):13-20, 1999.
- McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, Richert-Boe KE, and Henner WD. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 4(6):589-94, 1995.

- Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, and Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int. J. Cancer*, 89(3):300-4, 2000.
- Miyagi J, Kinjo T, Tsuchi K, Higa M, Iwamasa T, Kamada Y, and Hirayasu T. Extremely high Langerhans cell infiltration contributes to the favourable prognosis of HPV-infected squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Histopathology*, 38(4):355-67, 2001.
- Milide-langosch K, Riethdof S, Kraus-Poppinghaus A, Riethdof L, and Loning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV negative cervical adenocarcinomas. *Virchows. Arch.*, 439(1): 55-61, 2000.
- Miasko A, Niklinska W, Niklinski J, Chyczewska E, Naumnik W, and Chyczewski L. Detection of human papillomavirus in non-small cell lung carcinoma by polymerase chain reaction. *Folia Histochemica et Cytobiol.*, 39(2):127-8, 2001.
- Mills NE, Fishman CL, Rom WN, Dubin N, and Jacobson DR. Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 55(7):1444-7, 1995
- Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, and Haugen A. Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res*, 59(14):3317-20, 1999.
- .Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, and Haugen A. Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res*, 59(14):3317-20, 1999.
- Mumford JL, Williams K, Wilcosky TC, Everson EB, Young TL, and Santella R M. A sensitive color ELISA for detecting polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human tissues. *Mutation Res*, 359: 171-177, 1996.
- Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, and Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63(10):4417-21, 1989.
- Nagai Y, Maehama T, Asato T, and Kanazawa K. Detection of human papillomavirus DNA in primary and metastatic lesions of carcinoma of the cervix in women from Okinawa, Japan. *Am. J. Clin. Oncol.*, 24(2):160-6, 2001.
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S, and Kawajiri K. Polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-Transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res*, 53, 2994-2999, 1993.
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J, and Kawajiri K. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose.

- Cancer Res, 51(19):5177-80, 1991.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, and Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 59(1):65-85, 2000.
- Neuner A, Schindel M, Wildenberg U, Muley T, Lahm H, and Fischer TR. Cytokine secretion: clinical relevance of immunosuppression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 34: S79-S82, 2001.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, and Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368(6473):753-6, 1994.
- Nourva K, Soini Y, Kamel D, Pollanen R, Bloigu R, Vahakanogas K, Paakko P. p53 protein accumulation and the presence of human papillomavirus DNA in bronchiolo-alveolar carcinoma correlate with poor prognosis. *Int. J. cancer*, 64(6), 424-429, 1995.
- Nuber U, Schwarz SE, Scheffner M. The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur. J. Biochem.*, 254(3):643-9, 1998.
- O'Connor DP, Kay EW, Leader M, Atkins GJ, Murphy GM, and Mabruk MJ. p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus associated skin cancer. *J. Clin. Pathol.*, 54(7):539-42, 2001.
- Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, and Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J. Virol*, 69(7):4489-94, 1995.
- Okada T, Kawashima K, Fukushi S, Minakuchi T, and Nishimura S. Association between a cytochrome P450 CYP1A1 genotype and incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics*, 4(6):333-40, 1994.
- Olatunbosun O, Deneer H, and Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstetrics & Gynecol.*, 97(3):357-60, 2001.
- Otteneeder M, and Lutz WK. Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutation Res*, 424, 237-247, 1999.
- Paggi MG, Baldi A, Bonetto F, and Giordano A. Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer. *J. Cell. Biochem.*, 62(3):418-30, 1996.
- Palefsky JM, Holly EA, Gonzales J, Berline J, Ahn DK, and Greenspan JS. Detection of human papillomavirus DNA in anal intraepithelial neoplasia and anal cancer. *Cancer Res*, 51(3):1014-9, 1991.
- Palefsky JM, Winkler B, Rabanus JP, Clark C, Chan S, Nizet V, and Schoolnik GK.

- Characterization of in vivo expression of the human papillomavirus type 16 E4 protein in cervical biopsy tissues. *J. Clin. Invest.*, 87(6):2132-41, 1991.
- Papadopoulou K, Labropoulou V, Davaris P, Mavromara P, and Tsimara-Papastamatiou H. Detection of human papillomaviruses in squamous cell carcinomas of the lung. *Virchows. Archiv.*, 433(1):49-54, 1998.
- Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science*, 278: 1068-1073, 1996.
- Perrera F. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88: 496-509, 1996.
- Phelps WC, Munger K, Yee CL, Barnes JA, and Howley PM. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.*, 66(4):2418-27, 1992.
- Phillips DH, Hewer A, Martin CN, Garner RC, and King MM. Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature*, 336(6201):790-2, 1988.
- Phillips DH, Schoket B, Hewer A, Bailey E, Kostic S, and Vincze I. Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer*, 46, 569-575, 1990.
- Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, Tanner B, Brockerhoff P, Maeurer M, Hockel M, Hommel G, and Knapstein PG. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 11(1):39-48, 2001.
- Pillai MR, Lakshmi S, Sreekala S, Devi TG, Jayaprakash PG, Rajalakshmi TN, Devi CG, Nair MK, and Nair MB. High-risk human papillomavirus infection and E6 protein expression in lesions of the uterine cervix. *Pathobiology*, 66(5):240-6, 1998.
- Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P, Banks L. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene*, 9(7):1869-76, 1994.
- Plastaras TP, Guengerich FP, Nebert DW, and Marnett LJ. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J. Biol. Chem.*, 275, 11784-11790, 2000.
- Poirier MC. DNA adducts as exposure biomarkers and indicator of cancer risk. *Environ. Health. Perspect.*, 105, 907-912, 1997.

- Rajah TT, Dunn ST, and Pento JT. The influence of antiestrogens on pS2 and cathepsin D mRNA induction in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 16(2):837-42, 1996.
- Rannug A, Alexandrie AK, Persson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochromes P4501A1, 2D6, and 2E1: regulation and toxicological significance. *J. Occup. Environ. Med.*, 37, 25-36, 1995.
- Randerath E, Avitts TA, Reddy MV, Miller RH, Everson RB, and Randerath K. Comparative ³²P analysis of cigarette smoking-induced DNA damage in human tissues and mouse skin. *Cancer Res*, 46: 5869-5877, 1986.
- Reddy MV, and Randerath K. ³²P-postlabeling assay for carcinogen-DNA adducts: nuclease P1-mediated enhancement of its sensitivity and application. *Environ. Health. Perspect.*, 76: 41-47, 1987.
- Reszka E. Wasowicz W. Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk. *International Journal of Occup. Med. Environ. Health*, 14(2):99-113, 2001.
- Richardson H, Franco E, Pintos J, Bergeron J, Arella M, and Tellier P. Determinants of low-risk and high-risk cervical human papillomavirus infections in Montreal University students. *Sexually Transmitted Diseases*, 27(2):79-86, 2000.
- Risch HA, Howe GR, Jain M, Burch JD, Holowaty EJ, and Miller AB. Are female smokers at higher risk for lung cancer than male smokers ? A case-control analysis by histologic type. *Am. J. Epidemiol.*, 138: 281-293, 1993.
- Riethdof S, Riethdof L, Mild-Langosch K, Park JW, and Loning T. Differences in HPV16- and HPV18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchow. Arch.*, 437(5): 491-500, 2000.
- Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, and Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology*, 197(1):176-87, 1993.
- Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, and Bos JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.*, 48(20):5738-41, 1988.
- Rodriguez JW, Kirilin WG, Wirsy YG, Matheravidathu S, Hodge TW, and Urso P. Maternal exposure to benzo[a]pyrene alters development of T lymphocytes in offspring. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 21(2):379-96, 1999.
- Roggeband R, Wolterbeek AP, Rutten AA, and Baan RA. Comparative ³²P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene--DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes. *Carcinogenesis*, 14(9):1945-50, 1993.

- Roggeband R, Wolterbeek AP, Melis OW, Wittekoek ME, Rutten AA, Feron VJ, and Baan RA. DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogenesis*, 15(4):661-5, 1994.
- Rojas M, Alexandrov K, Cascorbi I, Brockmoller J, Likhachev A, Pozharisski K, Bouvier G, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, and Bartsch H. High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 MspI/MsPI-GSTM1*0/*0 genotypes. *Pharmacogenetics*, 8: 109-118, 1998.
- Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, Ogreid D, Ulvik A, Vu P, and Haugen A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, 18(7):1285-9, 1997.
- Ryberg D, Kure E, Lystad S, Skaug V, Stangeland L, Mercy L, Borresen AL, Haugen A. p53 mutation in lung tumors: relationship to putative susceptibility markers for cancer. *Cancer Res.*, 1994, 54, 1551-1555.
- Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, and Haugen A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.*, 54(22):5801-3, 1994.
- Salmi A, Ammala M, and Rutanen EM. Proto-oncogenes c-jun and c-fos are down-regulated in human endometrium during pregnancy: relationship to oestrogen receptor status. *Mol. Hum. Reproduction*, 2(12):979-84, 1996.
- Sang BC, and Barbosa MS Single amino acid substitutions in "low-risk" human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the "high-risk" HPV E7 oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(17):8063-7, 1992.
- Santella RM, Weston A, Perera FP, Trivers GT, Harris CC, Young TL, Nguyen D, Lee BM, and Poirier MC. Interlaboratory comparison of antisera and immunoassays for benzo[a]pyrene-diol-epoxide-I-modified DNA. *Carcinogenesis*, 9:1265 – 1269, 1988.
- Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T, Kusafuka T, Okada A, and Matsuda H. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int. J. Cancer*, 65(4):442-5, 1996.
- Savela S, and Hemminki, K. DNA adducts in lymphocytes and granulocytes of smokers and non-smokers detected by ³²p-postlabelling assay. *Carcinogenesis*, 12, 503-508, 1991.
- Schlegel R, Phelps WC, Zhang YL, and Barbosa M. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies

- viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO Journal*, 7(10):3181-7, 1988.
- Schoket B, Phillip DH, Kostic S, and Vincze I. Smoking-associated bulky DNA adducts in bronchial tissue related to CYP1A1 MspI and GSTM1 genotypes in lung patients. *Carcinogenesis*, 19:841-846, 1998.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63 (6): 1129-1136, 1990.
- Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse JM, Minna JD, and Howley PM. Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *J. Virol.*, 66(8):5100-5, 1992.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, and Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3):495-505, 1993.
- Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, and Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 125(1):1-9, 2001.
- Schwartz D, Almog N, Peled A, Goldfinger N, and Rotter V. Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the γ irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene*, 15: 2597-2607, 1997.
- Scully C, Field JK, and Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.*, 36(3):256-63, 2000.
- Seidegard J, Pero RW, Miller DG, and Beattie EJ. A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, 7(5):751-3, 1986.
- Seidegard J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, and Beattie EJ. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis*, 11(1):33-6, 1990.
- Selinka HC, Sotlar K, Klingel K, Sauter M, Kandolf R, and Bultmann B. Detection of human papillomavirus 16 transcriptional activity in cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions and cervical carcinomas by nested reverse transcription-polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Laboratory Invest.*, 78(1):9-18, 1998.
- Seo YS, Muller F, Lusky M, and Hurwitz J. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc.*

- of Nat. Acad. Sci USA, 90(2), 702-6, 1993.
- Serraino D, Piselli P, and Scognamiglio P. Viral infections and cancer: epidemiological aspects. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 15 (3):224-228, 2001.
- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, and Rollins BJ. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res*, 55(3):505-9, 1995.
- Shimizu E, Coxon A, Otterson GA, Steinberg SM, Kratzke RA, Kim YW, Fedorko J, Oie H, Johnson BE, and Mulshine JL. RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma. *Oncogene*, 9(9):2441-8, 1994.
- Seidegard J, and Pero RW. The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu. *Klinische Wochenschrift*, 66 Suppl 11:125-6, 1988.
- Sharma M, and McBean EA. PAH deposition to snow surface. Chemical analysis and interpretation of results. *Environ. Science & Pollut. Res.*, 8(1):11-8, 2001.
- Shields PG, Bowman ED, Harrington AM, Doan VT, and Weston, A. Polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Res*, 53: 3486-3492, 1993.
- Shields PG. Epidemiology of tobacco carcinogenesis. *Current Oncology Reports*, 2(3):257-62, 2000.
- Shields PG, and Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J. Clin. Oncol.*, 18(11):2309-15, 2000.
- Shinozaki R, Inoue S, Choi KS, and Tatsuno T. Association of benzo[a]pyrene-diol-epoxide-deoxyribonucleic acid (BPDE-DNA) adduct level with aging in male smokers and nonsmokers. *Arch. Environ. Health*, 54(2): 79-85, 1999.
- Shimizu T, and Sekiya T. Loss of heterozygosity at 9p21 loci and mutations of the MTS1 and MTS2 genes in human lung cancers. *Int. J. Cancer*, 63(5):616-20, 1995.
- Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, and Rodenhuis S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J. Nat. Cancer Inst.*, 83(14):1024-7, 1991.
- Slebos RJ, Rodenhuis S. The ras gene family in human non-small-cell lung cancer. *J. Nat. Cancer Inst., Monographs.* (13):23-9, 1992
- Smith SE, Koegl M, Jentsch S. Role of the ubiquitin/proteasome system in regulated protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.*, 377(7-8):437-46, 1996.

- Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pollanen R, Vahakanogas K, Lehto VP, Paakko P. Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma less comments. *Thorax*, 51(9): 878-879, 1996.
- Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer. *Critical Rev. Toxicol.*, 27(4):319-65, 1997.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, and Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 393 (6682):229-34, 1998.
- Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, and Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontics*, 91(1):62-9, 2001.
- Sun EC, Fears TR, and Goedert JJ. Epidemiology of squamous cell conjunctival cancer. *Cancer Epidem. Biomar. Prev.*, 6(2):73-7, 1997.
- Syrjanen SM, and Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann. Med.*, 31(3):175-87, 1999.
- Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, and Targosz D. Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environ. Health Perspect.*, 102(3):302-4, 1994.
- Szabo I, Sepp R, Nakamoto K, Maeda M, Sakamoto H, Uda H. Human papillomavirus not found in squamous and large cell lung carcinomas by polymerase chain reaction. *Cancer*, 73 (11):2740-2744, 1994.
- Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yoshimatsu T, Yoshino I, Yano K, Nakanishi R, Ichiyoshi Y, and Yasumoto K. Prognostic value of the immunohistochemical detection of p16INK4 expression in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 80(3):389-95, 1997.
- Talis AL, Huijbregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J. Biochem. Cell.*, 273 (11): 6439-6445, 1998.
- Tang DL, Rundle A, Warburton D, Santella RM, Tsai WY, Chiamprasert S, Hsu Y Z, and Perera FP. Association between both genetic and environmental biomarkers and lung cancer: evidence of a greater risk of lung cancer in women smokers. *Carcinogenesis*, 19:1949-1953, 1998.
- Tang D, Santella RM, Blackwood AM, Young TL, Mayer J, Jaretzki A, Grantham S, Tsai WY, and Perera FP. A molecular epidemiological case-control study of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomar Prev*, 4: 341-346, 1995.
- Tay SC, Tsai SF, Lee SS. Lung cancer in Taiwan. *Natl Public Health Assoc (ROC)*,

- 8(3), 189-201, 1988.
- Tefre T, Ryberg D, Haugen A, Nebert DW, Skaug V, Brogger A, Borresen AL. Human CYP1A1 (cytochrome P(1)450) gene: lack of association between the Msp I restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics*, 1(1):20-5, 1991.
- Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Douagui H, and Kleisbauer JP. Detection of human papillomavirus DNA in primary lung carcinoma by nested polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.*, 41(8):1093-7, 1995
- Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Castelnau O, and Kleisbauer JP. Detection of human papillomavirus by polymerase chain reaction in primary lung carcinoma. *Bulletin du Cancer*, 83(10):842-6, 1996.
- Thomas DB, Ray RM, Kuypers J, Kiviat N, Koetsawang A, Ashley RL, Qin Q, and Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am. J. Epidemiol.*, 153(8):740-8, 2001.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, and Abraham RT. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.*, 13(2):152-7, 1999.
- To-Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Galan MC, Fuentes, M, Ramon JM, Rodmilans M, Fuguet E, and Corbella J. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis* 1997, 18, 1529-1533.
- Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S. United States lung carcinoma incidence trends. *American Cancer Society*, 77, 2464-2470, 1996.
- Tseng JE, Rodriguez M, Ro J, Liu D, Hong WK, and Mao L. Gender differences in p53 mutational status in small cell lung cancer. *Cancer Res*, 59(22):5666-70, 1999.
- Tsai MJ, and O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.*, 63:451-86, 1994.
- Tsao YP, Yang KY, Han CP, Yin CS, Yang YF, and Chen SL. Genital human papillomavirus infections in Taiwan. *Int. J. Gynaecol. Obstetrics*, 44(1):39-45, 1994
- Tsuhako K, Nakazato I, Hirayasu T, Sunakawa H, and Iwamasa T. Human papillomavirus DNA in adenosquamous carcinoma of the lung. *Journal of Clin. Pathol.*, 51(10):741-9, 1998.
- US Public Health Service. The health consequences of smoking: Cancer. A Report of US DHHS, Public Health Service, Office on smoking and Health, 1982.
- Vahakangas KH, Bennett WP, Castren K, Welsh JA, Khan MA, Blomeke B, Alavanja

- MC, and Harris CC. p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women. *Cancer Res.*, 61(11):4350-6, 2001.
- van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, and Walboomers JM. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J. General Virol.*, 81:317-25, 2000.
- van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B, Denkers F, Smeele LE, Snow GB, and Brakenhoff RH. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 93(2):232-5, 2001.
- van Poppel G, de Vogel N, van Balderen PJ, and Kok FJ. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. *Carcinogenesis*, 13(2):303-5, 1992.
- Van Ranst MA, Tachezy R, Delius H, and Burk RD. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomaviru Rep*, 4: 61-65, 1993.
- van Schooten FJ, Hillebrand MJ, van Leeuwen FE, van Zandwijk N, Jansen HM, den Engelse L, and Kriek E. Polycyclic aromatic hydrocarbon--DNA adducts in white blood cells from lung cancer patients: no correlation with adduct levels in lung. *Carcinogenesis*, 13(6):987-93, 1992.
- van Schooten FJ, Hillebrand MJ, van Leeuwen FE, Lutgerink JT, van Zandwijk N, Jansen HM, Kriek E, and Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis*, 11(9):1677-81, 1990.
- van Schooten FJ, Godschalk RWL, Breedijk A, Maas LM, Kriek E, Sakai H, Wigbout G, Baas P, Van't Veer L, and Van Zandwijk N. ³²P-Postlabeling of aromatic DNA adducts in white blood cells and alveolar macrophages of smokers: saturation at high exposures. *Mutation Res.*, 378: 65-75, 1997.
- Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, and Durrer JD. Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue. *FASEB J*, 12(13):1409-17, 1998.
- Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin. Chem.*, 42(6 Pt 1):858-68, 1996.
- Vainio H, and Boffetta P. Mechanisms of the combined effect of asbestos and smoking in the etiology of lung cancer. *Scandinavian Journal of Work, Environ. Health*. 20(4):235-42, 1994.
- Wang Y, Ichiba M, Iyadomi M, Zhang J, and Tomokuni K. Effects of genetic polymorphism of metabolic enzymes, nutrition, and lifestyle factors on DNA adduct formation in lymphocytes. *Industrial Health*, 36(4):337-46, 1998.

- Wang YC, Lee HS, Chen SK, Yang SC, and Chen CY. Analysis of K-ras gene mutations in lung carcinomas: correlation with gender, histological subtypes, and clinical outcome. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124(9):517-22, 1998.
- Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, and Lee H. High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res*, 58(2):328-33, 1998.
- Wang YC, Lee HS, Chen SK, Chang YY, and Chen CY. Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur. J. Cancer*, 35(2):226-30, 1999.
- Wang TJ, Zhou BS, and Shi JP. Lung cancer in nonsmoking Chinese women: a case-control study. *Lung Cancer* 14 suppl. 1: S93-S98, 1996.
- Wang TJ, and Zhou BS. Meta-analysis of the potential relationship between exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking Chinese women. *Lung Cancer*, 16: 145-150, 1997.
- Warren AJ, and Shields P. Molecular epidemiology: carcinogen-DNA adducts and genetic susceptibility. *Mol. Epidemiol.*, 216, 172-180, 1997.
- Washimi O, Nagatake M, Osada H, Ueda R, Koshikawa T, Seki T, Takahashi T, and Takahashi T. In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*, 55(3):514-7, 1995.
- Werness BA, Levine AJ, and Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248(4951):76-9, 1990.
- Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, and Band V. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(9):3687-91, 1995.
- Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, Askin FB, Rodenhuis S, and Hruban RH. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 72(2):432-8, 1993.
- Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res.*, 56:4103-4107, 1996.
- Welt A, Hummel M, Niedobitek G, and Stein H. Human papillomavirus infection is not associated with bronchial carcinoma: evaluation by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J. Pathol.*, 181(3):276-80, 1997.
- Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, Askin FB, Rodenhuis S, Hruban RH. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung.

- Cancer, 72(2):432-8, 1993.
- Whitlock JP, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q, and Li H. Cytochromes P450: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.*, 10(8):809-18, 1996.
- Wiencke JK, Kelsey KT, Varkonyi A, Semey K, Wain JC, Mark E, and Christiani DC. Correlation of DNA adducts in blood mononuclear cells with tobacco carcinogen-induced damage in human lung. *Cancer Res*, 55(21):4910-4, 1995.
- Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, and Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 152(1):145-56, 1998.
- Wolterbeek AP, Roggeband R, Steenwinkel MJ, Baan RA, and Rutten AA. Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by ³²P-postlabeling analysis and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis*, 14(3):463-7, 1993
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, and June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 61(12):4766-72, 2001.
- Wu-Williams AH, Dai XD, Blot W, Xu ZY, Sun XW, Xiao HP, Stone BJ, Yu SF, Feng YP, and Ershow AG. Lung cancer among women in north-east China. *British J. Cancer*, 62(6):982-7, 1990
- Xiao S, Li D, Corson JM, Vijg J, and Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 genes in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 55(14):2968-71, 1995.
- Xie H, Zhao Z, and Wang S. PAH-DNA adduct in human lung cancer explants. A preliminary study. *Chung-Hua Chung Liu Tsa Chih.*,20(3):187-90, 1998.
- Xing LQ, and Liu HR. Si JY. Analysis of the characteristics of human papilloma virus infection in 85 neoplasms of the respiratory system in adult patients. *Chung-Hua Chung Liu Tsa Chih.*, 16(6):424-7, 1994.
- Xing LQ, Liu HR, and Si JY. Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the lung by multiple polymerase chain reaction. *Chung-Hua Chieh Ho Ho Hu Hsi Tsa Chih Chinese J. Tubercul. Respir. Diseases*, 16(5):275-7, 319, 1993.
- Xu X, Kelsey KT, Wiencke JK, Wain JC, and Christiani DC. Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomar. Prev.*, 5(9):687-92, 1996.
- Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA, Nohaile M, and Botchan M. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. of Nat.*

- Acad. Sci USA, 90(11):5086-90, 1993.
- Yang CC, Jenq SN, and Lee H. Characterization of the carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in cooking aerosols under domestic conditions. *Carcinogenesis*, 19:359-363, 1998.
- Yang SC, Jenq SN, Kang ZC and 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.*, 2000.
- Yokota J. Mori N. Akiyama T. Shimosato Y. Sugimura T. Terada M. Multiple genetic alterations in small-cell lung carcinoma. *Princess Takamatsu Symposia*, 20:43-8, 1989.
- Yousem SA. Ohori NP. Sonmez-Alpan E. Occurance of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasmas. *Cancer*, 69 (3):693-697, 1992.
- Zang EA, and Wynder EL. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 88: 183-192, 1996.
- Zang EA, and Wynder EL. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J. Nat. Cancer Inst.*, 88(3-4):183-92, 1996.
- Zalvide J, and DeCaprio JA. Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-T-antigen-mediated transformation. *Mol. Cell. Biol.*, 15(10):5800-10, 1995.
- Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, and Tommasino M. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res.*, 61(2):608-11, 2001.
- Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, and Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13(11):2323-30, 1996.
- Zhou JX, Niehans GA, Shar A, Rubins JB, Frizelle SP, and Kratzke RA. Mechanisms of G1 checkpoint loss in resected early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 32(1):27-38, 2001.
- Zimmermann H. Degenkolbe R. Bernard HU. O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.*, 73(8):6209-19, 1999.
- Zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184 (1): 9-13, 1991.
- Zur Huasen H. Human pathogenic papillomaviruses. Berlin: Springer- Verlag, 83-100, 1994.

7. 表與圖

Table 1. Literature reviews from previous studies on DNA adduct levels of lung cancer patients.

Authors	Tissues	Case no.	Adduct levels/ (/10 ⁸ nucleotides)	Population
Tang et al., 2001	WBC	89	11.04	USA
Hou et al., 2001	WBC	171	3.4	Sweden
Wang et al., 1998	WBC	158	0.47-2.05	Japan
Rojas et al., 1998	Lung	20	0.7-6.4	Russia
van Schooten et al., 1992	WBC	38	0.3-407	Amsterdam
Mollerup et al., 1999	Lung	122	3.94-24.86	Norway
Rojas et al., 1998	Lung		276.2	Russia
Xie et al., 1998	Lung		276.2	China
Ryberg et al., 1997	Lung	138	2.78-25.77	Norway
Ryberg et al., 1994	Lung	63	0.9-21.44	Norway
Alexandor et al., 1992	Lung	13	1.3-13.4	France
Geneste et al., 1991	Lung	20	0.23-13.4	France
van Schooten et al., 1990	Lung	21	19-420	Amsterdam
Phillips et al., 1988	Lung	30	1.5-34.3	UK
Cheng et al., 2000	Lung	73	2.4-147.1	Taiwan
Cheng et al., 2001	Lung	62	2.0-165.92	Taiwan

The DNA adduct levels were evaluated by ³²P-postlabelling.

Data were presented as the mean and the ranges of detected values.

Table 2. CYP1A1 studies with relevance to lung cancer susceptibility and functionality of genetic polymorphisms.

Study	Population (region)	Mutation(s) examined	Finding and correlations
Goto et al., 1996 (75)	Japanese	<i>MspI, GSTM1</i>	CYP1A1*2A (even one allele) was associated with decreased survival, particularly being combined with GSTM1-null genotype (prognostic significance)
Jacquet et al., 1996 (36)	Caucasian (European)	<i>MspI</i>	NO association of CYP1A1*2A variants with susceptibility or inducibility was found, but only slightly higher for both CYP1A1*1/2A and CYP1A1*2A/2A; no correlation between CYP1A1*2A lung cancer and inducibility
Kawajiri et al., 1996 (76)	Japanese	<i>MspI, Ile Val GSTM1</i>	CYP1A1*2A/2A and CYP1A1*2C/2C were significantly associated with p53 mutation in lung cancer; synergism when combined with GSTM1-null
Kiyohara et al., 1996 (61)	Japanese	<i>MspI, Ile Val</i>	Cosegregation of CYP1A1*2A/2A genotype with AHH inducibility (noninduced lymphocytes induced with 3-methylcholanthrene); CYP1A1*2C/2C mutants possess significantly higher AHH activity compared with that of heterozygotes and wild type ^b
Xu et al., 1996 (37)	Caucasian (North America)	<i>MspI</i>	CYP1A1*2A (even one allele) was associated with increase lung cancer risk (smoking dose was relevant)
Zhang et al., 1996 (62)	None; <i>Esherichia coli</i> expression	<i>Ile Val</i>	CYP1A1*2C variant had slightly but significantly higher EROD activities. Sililar benzo(a)pyrene oxidation activities: Suggesting that no causal effect on susceptibility ^b
Bouchardy et al., 1997 (38)	Caucasian (France)	<i>MspI, Ile Val</i>	No association of CYP1A1*2A and/or CYP1A1*2C variants with lung cancer risk (heterozygotes included in the at-risk group) was seen. Associated risk was not increased after adjustment for tobacco and asbestos exposure, nor when stratified with smoking status, daily consumption, smoking duration, and histological type

Table 2. Continued.

Garcia-Closas et al., 1997 (39)	Mostly Caucasian (North American)	<i>MspI, GSTM1</i>	<i>CYP1A1*2A</i> (even one allele) was associated with increased lung cancer risk, evident after adjusting for smoke pack-years; additionally <i>GSTM1</i> deletion may contribute to lung cancer risk in combination with <i>CYP1A1*2A</i> heterozygous variant [expansion of study by Xu et al. (37)]
Ishibe et al. 1997(40)	Maxican-and African Americans	<i>MspI,Ile Val, CYP1a1*3^c</i>	<i>CYP1A1*2A</i> or <i>CYP1A1*2C</i> (one or more alleles) was associated with an approximate 2-fold increase in lung cancer risk among light smokers
Mooney et al., 1997 (40)	Caucasian (North American)	<i>MspI,Ile Val, GSTM1</i>	Smokers with heterozygote or homozygote <i>CYP1A1*2C</i> genotypes had significantly higher levels of DNA damage (PAH adducts) in circulating lymphocytes
Ohshima and Xu, 1997 (77)	Japanese	<i>Ile Val</i>	No significant relation between p53 mutations and <i>CYP1A1*2C</i> and/or <i>GSTM1</i> genotypes in lung cancer patients was detected.
Person et al, 1997(63)	None; yeast	<i>Ile Val</i>	No differences in K_M or V_{max} for EROD activities between <i>CYP1A1*1</i> and <i>CYP1A1*2C</i> variants: these variants were not functionally important
Hong et al, 1998(41)	Korean	<i>MspI,Ile Val, GSTM1</i>	No association with lung cancer; <i>CYP1A1*2C</i> allele was more prevalent among controls than in lung cancer patients, particularly SCC (protective-like effect); no difference in genotypic frequencies of <i>CYP1A1*2A</i> variants between lung cancer and control, similar results when combined with <i>GSTM1</i> -null genotype.
Le Marchand et al, 1998(42)	Caucasian, Japanese, Hawaiian	<i>MspI, GSTM1</i>	<i>CYP1A1*2A</i> (at least one variant allele) was associated with increased risk of SCC, risk was increased when combining with <i>GSTM1</i> (no association with overall lung cancer risk ^b)
Przygodzki et al, 1998 (78)	Caucasians (North American)	<i>MspI,Ile Val, GSTM1, CYP 2E1</i>	<i>CYP1A1*2C</i> (mostly heterozygous variants) was found in excess among lung cancer patients with p53 mutations, no significant increase in what mutations when combined with <i>GSTM1</i> -null genotype

Table 2. Continued.

Saarikoski et al.,1998 (74)	Finnish	<i>Msp1,Ile</i>	<i>Val</i>	<i>CYP1A1</i> *2A heterozygote exhibited the most intense results in both in situ hybridization and immunohistochemical analyses for <i>CYP1A1</i> in human lung tissue (one patient)
Schoket et al.,1998(70)	Hungarian	<i>Msp1</i>		No statistically significant correlation between <i>CYP1A1</i> *2A genotypes and bronchial tissue DNA adducts after adjustment for either smoking status or malignancy
Sugimura et al .,1998 (43)	Japanese (Okinawa)	<i>Ile</i>	<i>Val</i>	<i>CYP1A1</i> *2C/2C genotype was associated with a significantly
Taioli et al., 1998 (44)	African-Americans	<i>Msp1, Ile</i>	<i>Val,</i>	No association with lung cancer when examined individually, but composite genotype of <i>CYP1A1</i> *2A/2B was associated with overall lung cancer risk
Bennett et al., 1999 (45)	Caucasians (Females, North American)	<i>Ile</i>	<i>Val,</i>	No association between <i>CYP1A1</i> *2C (*2A not examined) variant and lung cancer risk was attributable to environmental tobacco smoke exposure in never-smoking women, association for <i>GSTM1</i> -null alone was found.
Butkiewicz et al., 1999 (71)	Polish	<i>GSTM1,</i> <i>GSTT1</i> <i>Ile</i>	<i>Val,</i>	<i>CYP1A1</i> *1/2C(*2A not examined) was significantly associated with high DNA-adduct levels in lung tissues from individuals diagnosed with SCC when combined with <i>GSTM1</i> -null; a significant prevalence of this combined genotype was also found in patient with high adduct levels diagnosed with AC; relationship was not observed among <i>GSTM1</i> -positive individuals
Kim et al., 1999 (46)	Korean	<i>GSTM1,</i> <i>GSTP1,</i> <i>CYP2D6</i> <i>Msp1, Ile</i>	<i>Val,</i>	No association of <i>CYP1A1</i> *2A or *2B variants with lung cancer was observed in Koreans.A solitary *2C allele (i.e., no *2A variants detected) was identified; <i>CYP1A1</i> *3 and *4 variants were not detected in this population.
Persson et al., 1999 (47)	Chinese	<i>CYP1A1</i> *3 <i>CYP1A1</i> *4 ^d <i>Msp1, Ile</i>	<i>Val,</i>	No evidence on that carriers of certain alleles have an increase risk of lung cancer was available. Frequency of <i>CYP1A1</i> *2A and *2B alleles among lung cancer patient and controls was not significantly different
		<i>GSTM1,</i> <i>CYP2E1,</i> <i>HYL</i> ^e		

Table 2. Continued.

Rusin et al., 1999 (79)	Polish	<i>Ile Val</i>	No statistically significant association was found between <i>p53</i> mutations and <i>CYP1A1*2C</i> . This may be attributable to lack of statistical power.
Wang et al., 1999 (80)	Taiwanese	<i>MspI, GSTM1</i>	No association of <i>CYP1A1*2A</i> variants or <i>GSTM1</i> -null genotype with <i>p53</i> tumor suppressor gene mutation was found, <i>CYP1A1</i> and <i>GSTM1-1</i> not indicated in were not responsible for the deletions in the immediate vicinity of repetitive sequence and /or tandem repeat sequences observe in <i>p53</i> in Taiwanese lung cancer patients
Anttilla et al., 2000 (114)	Finnish	<i>CYP1A1, AHR, ARNT</i>	No association of poorly induced <i>CYP1A1</i> phenotype in human lung cancer microsomes with inactivating mutation in the structure or regulatory portions of <i>CYP1A1</i> , <i>AHR</i> , or the <i>AHR</i> nuclear translocator gene (<i>ARNT</i>)
Cheng et al., 2000 (72)	Taiwanese	<i>MspI, GSTM1</i>	No association of <i>CYP1A1*2A</i> variant alone or in combination with <i>GSTM1</i> -null with DNA-adduct levels in human lung tissue; adduct levels did correlate with <i>CYP1A1</i> expression by immunohistochemistry
Dolzan et al., 2000 (48)	Slovenian	<i>MspI, Ile Val</i>	No association of <i>CYP1A1*2A</i> or <i>2B</i> alleles but possible association between <i>CYP1A1*2C/2C</i> and SCC (no statistical power) ^b was found; population frequency of this allele was too low to be a potentially useful marker.
Dresler et al., 2000 (49)	Predominantly Caucasians (North American)	<i>Ile Val, GSTM1</i>	<i>CYP1A1*2C</i> (<i>*2A</i> not examined) variants (mostly heterozygous) were associated with increased risk of lung cancer for females particularly in combination with <i>GSTM1-nul</i>
Lin	Table 2. Continued.	<i>1, HYL</i>	<i>CYP1A1*2A/2A</i> genotype was associated with SCC and risk was increased in combination with high and normal <i>HYL1</i> genotypes
London et al., 2000 (51)	Chinese (Men in Shanghai)	<i>Ile Val, GSTM1</i>	No association of <i>CYP1A1*2C</i> variant alleles with lung cancer overall was seen. This suggested that individuals with at least one <i>CYP1A1*2C</i> alleles might be related to lung cancer risk among low-level smokers, particularly those with <i>GSTM1</i> -null.

Table 2. Continued.

Smart and Daly, 2000 (64)	Caucasians	<i>CYP1A1*1B^f</i> , <i>CYP1A1*1C^f</i> , <i>Msp1</i> , <i>Ile</i> <i>ValCYP1A1*3</i> , <i>CYP1A1*4</i>	No association of any of the variant alleles with differences in CYP1A1 activity (EROD) or immunoblotting in cultured lymphocytes was seen, no correlation with <i>GSTM1</i> -null genotype; an association with <i>AHR</i> polymorphism was suggested (see Table 2).
Schwarz et al., 2000 (65)	None; increase cell expression	<i>Ile Val</i> , <i>CYP1A1*4</i>	<i>CYP1A1*2</i> and <i>*4</i> variants encoded proteins CYP1A1.2 and CYP1A1.4 have slightly increased K_M for EROD, but equivalent V_{max} compared with CYP1A1.1. All three variants hydroxylate steroid hormones with varying efficiencies in a stereo and regioselective manner.
Schwarz et al., 2001 (66)	None; insect cell expression	<i>Ile Val</i> , <i>CYP1A1*4</i>	<i>CYP1A1*2</i> and <i>*4</i> variants encoded proteins CYP1A1.2 and CYP1A1.4 have lower K_M for all bezo(a)pyrene metabolites compared with CYP1A1.1 and exhibited significantly increased formation of diol epoxide 2, and exhibited only minor differences in kinetic behavior for EOD with slightly higher V_{max} values.

^a SCC, squamous cell carcinoma; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-dioxin; SCLC, small cell lung cancer; AC, adenocarcinoma; *CYP2E1*, cytochrome P450 2E1 gene; *CYP2D6*, cytochrome P450 2D6 gene; *GSTP1*, glutathione S-transferase P1 gene; *GSTT1*, glutathione S-transferase T1 gene; BPDE, benzo(a)pyrene diol epoxide; ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator gene.

^b This point is especially pertinent to the study.

^c Race-specific African-American polymorphism.

^d Exon 7 *Thr* to *Asn* *CYP1A1* genetic polymorphism.

^e Microsomal epoxide hydrolase gene.

^f Novel *CYP1A1* genetic polymorphisms; *CYP1A1*1A*, wild type.

(References from Graeme et al., 2001)

Table 3. Literature review from previous studies of p53 mutation frequencies in lung cancer study.

Reference	Case no.	Mutation frequency (%)	Sample source
Jassem et al., 2001	322	29	Poland
Vahakangas et al., 2001	126	22	Finland
Husgafvel-Pursiainen et al., 2000	157	17	Finland
Tseng et al., 1999	65	57	USA
Robert Gealy., 1999	55	29	USA
Wang et al., 1998	60	18	Taiwan
Fukuyama et al., 1997	159	36	Japan
Liloglou et al., 1997	46	28	Greece
Kure et al., 1996	115	49	Norway
Takagi et al., 1995	35	20	Hong Kong
	35	31	Japan
Present study	163	12	Taiwan

Table 4. The association between p53 mutations and clinical characteristics in lung cancer patients.

Parameter	p53 mutations		P
	Negative (%)	Positive (%)	
Gender			
Female (n=51)	49 (96.1)	2 (3.9)	0.038
Male (n=112)	95 (84.8)	17 (15.2)	
Smoking status			
No (n=91)	82 (90.1)	9 (9.9)	0.468
Yes (n=72)	62 (86.1)	10 (13.9)	
Tumor type			
AD (n=97)	89 (91.8)	8 (8.2)	0.135
SQ (n=66)	55 (83.3)	11 (16.7)	
Tumor stage			
I (n=63)	59 (93.7)	4 (6.3)	0.035
II (n=25)	24 (96.0)	1 (4.0)	
III (n=75)	61 (81.3)	14 (18.7)	
T factor			
1 (n=10)	9 (90.0)	1 (10.0)	0.264
2 (n=120)	107 (89.2)	13 (10.8)	
3 (n=24)	19 (79.2)	5 (20.8)	
4 (n=9)	9 (100.0)	0 (0)	
N factor			
0 (n=74)	69 (93.2)	5 (6.8)	0.132
1 (n=33)	30 (90.9)	3 (9.1)	
2 (n=55)	44 (80.0)	11 (20.0)	
3 (n=1)	1 (100.0)	0 (0)	

χ^2 test was used for statistical analysis.

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinom

Table 5. The location, type, surrounding sequences of p53 mutation and immunostaining in lung cancer patients with p53 mutation.

Patient no.	Age	Sex	Smoking habits	Tumor			p53 mutation				P53 IHC
				Type	Stage	Exon	Location	Type	Surrounding sequence		
677E*	64	M	+	SQ	IIIa	4	Codon 88	1-bp del	CCA[G]CCCC	CCACCCCC	-
717E*	72	M	+	SQ	IIIa	4	Codon 117	1-bp del	TCT[G]GGACA	TCTGGACA	-
595I*	77	M	-	SQ	I	5	Codon 156&157	4-bp del	ACCC[GCGT]CCGC	ACCCCCGC	-
345F*	69	M	+	SQ	IIIa	6	Codon 213&214	4-bp del	TTTC[GACA]tTAGT	TTTCTAGT	-
586E*	37	F	-	SQ	I	7	Codon 243-246	8-bp del	AT[GGGCGGCA]TG	ATTG	-
240D*	69	M	+	SQ	I	7	Codon 251-254	12-bp del	CCA[ATCCTCACCATCATC]	CCCATC	+
167D*	77	M	+	SQ	IIIa	7	Codon 261	1-bp del	TCCA[G]GTCA	TCCAGTCA	-
968F*	68	M	+	SQ	II	4	Codon 107	C:G	G:C	TAC TAG	-
836C*	66	M	+	SQ	IIIa	8	Codon 298	G:C	T:A	GAG TAG	-
065J*	68	M	+	AD	IIIa	7	Codon 249	G:C	T:A	AGG AGT	+
896H*	66	M	-	AD	IIIa	8	Codon 276	C:G	A:T	GCC GAC	+
190J	53	M	-	AD	IIIa	6	Codon 194	T:A	G:C	CTT CGT	+
368G	66	M	-	AD	IIIa	8	Codon 286	G:C	C:G	GAA CAA	+
763B	52	M	-	AD	IIIa	7	Codon 240	T:A	A:T	AGT AGA	+
248E	58	M	+	SQ	I	6	Conon 220	A:T	G:C	TAT TGT	+

Table 5. Continued.

Patient no.	Age	Sex	Smoking habits	Tumor				p53 mutation				P53 IHC
				Type	Stage	Exon	Location	Type	Surrounding sequence			
440A	64	M	-	AD	I	6	Codon 194	T:A	G:C	GTT	CGT	+
151G	60	F	-	AD	IIIa	7	Codon 234	T:A	A:T	TAC	AAC	+
868E	64	M	+	SQ	I	5	Codon 179	C:G	T:A	CAT	TAT	+
691A	71	M	+	SQ	I	5	Codon 135	G:C	T:A	TGC	TTC	+

* The p53 mutations have been reported previously (Wang et al., 1998)

Table 6. Literature reviews of immunohistochemical analysis of Rb protein expression in lung cancer patients.

Reference	Patients no.	Rb negative immunostaining (%)
Xu et al., 1991	36	36
Higashiyama et al., 1994	100	6
Xu et al., 1996	119	16
Kratzke et al., 1996	100	15
Sakaguchi et al., 1996	61	38
Masayuki et al., 1997	208	20
Betticher et al., 1997	51	33
Tamura et al., 1997	20	10
Dosaka et al., 1997	91	21
Marchetti et al., 1998	42	20
Tanaka et al., 1998	101	42
Kawabuchi et al., 1999	51	20
Brambilla et al., 1999	168	12
Cao et al., 2001	31	19
Sugio et al., 2001	90	57
Xue et al., 2001	50	16
Present study	137	82

Table 7. Literature reviews of Human papillomavirus detection in lung cancer patients.

Study location	Positive (%)	Patient no.	Detection method	References
Poland	10	40	PCR	Miasko et al., 2001
Okinawa	80	41	PCR	Iwamasa et al., 2000
France	2.7	185	Hybird Capture II assay	Clavel et al., 2000
Okinawa	78.3	23	NISH, PCR	Tsuhako et al.,1998
Greece	39.4	29	ISH	Papadopoulou et al., 1998
USA	5.9	34	PCR	Bohlmeyer et al., 1998
Okinawa	79		PCR	Nakazato et al., 1997
Germany	0	38	ISH, PCR	Weit et al., 1997
France	14.3	28	PCR	Thomas et al., 1996
Okinawa	79		PCR	Hirayasu et al., 1996
	53		NISH	
Niigata	30		PCR	
	20		NISH	
Finland	30	43	PCR	Soini et al., 1996
Beijing	50	40	PCR	Da et al., 1996
Finland	36	22	ISH	Nuorva et al., 1995
France	16	31	PCR	Thomas et al., 1995
Beijing	12	34	PCR	Zhang et al., 1995
Wuhan	53	30	PCR	Li et al., 1995
Taiwan				
HPV16	32.6	141	PCR	Cheng et al., 2001
	16.3	141	NISH	
HPV18	41.1	141	PCR	
	36.9	141	NISH	

Table 8. Literature reviews of the 50% inhibition dose of different antibodies for BPDE-N2-dG adduct detection.

Antibody	50% inhibition (fmol)	Reference
Pab#29	156	Hsu et al. (1995)
Mab8E11	460	Carcinogenesis
Mab5D2	1080	
Mab5D11	500	
F29	105	van Schooten et al. (1987)
F30	50	Carcinogenesis
NCI	50	
4ID3	17	
29	34.3-86.0	Sentella et al. (1988)
33	12.7-44.0	Carcinogenesis
3A	10.3-115.0	
No.23	14	Mumford et al. (1996) Mutation Res.
HL1	16	Cheng et al., 2001

Table 9. Characteristics of study subjects in this study.

Characteristics	Lung cancer patients (n = 73)	Non-cancer controls (n = 33)	P
Age	57.89 ± 7.12	49.27 ± 17.18	0.160
Sex			
Male	51	24	
Female	22	9	0.764
Tumor type			
AD	48	-	
SQ	25	-	
Tumor stage			
I	30	-	
II	11	-	
III	29	-	
IV	3	-	
Smoking status			
No	38	22	
Yes	32	11	0.234
Unknown	3	0	
CYP1A1 polymorphism			
m1/m1 (A)	24	8	
m1/m2 (B)	35	15	
m2/m2 (C)	14	10	0.400
GSTM1 polymorphism			
Negative (-)	34	17	
Positive (+)	39	16	0.637
CYP1A1/GSTM1			
A / -	24	11	
A / +	35	12	
BC / -	10	6	
BC / +	4	4	0.525

The difference of age between lung cancer and non-lung cancer patients was calculated by Wilcoxon rank sums test. The other status differences between lung cancer and non-lung cancer patients were calculated by χ^2 test.

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinoma.

Table 10. Comparison of DNA adduct levels between lung cancer patients and non-cancer controls with different gender, smoking status, and polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1.

Parameter	DNA adduct levels / 10 ⁸ nucleotides				P
	N	Lung cancer	N	Non-cancer	
Type	73	49.58 ± 33.39	33	18.00 ± 15.33	< 0.001
Gender					
Female	22	58.03 ± 32.65	9	16.44 ± 11.20	< 0.001
Male	51	45.94 ± 33.36	24	18.59 ± 16.79	< 0.001
P		0.118		0.827	
Smoking status					
No	38	49.28 ± 30.73	22	19.01 ± 17.90	< 0.001
Yes	32	49.03 ± 37.21	11	15.99 ± 8.52	0.002
P		0.719		0.836	
CYP1A1 polymorphism					
m1/m1 (A)	24	37.99 ± 24.22	8	17.61 ± 10.78	0.014
m1/m2 (B)	35	50.24 ± 30.80	15	21.38 ± 20.60	0.001
m2/m2 (C)	14	67.78 ± 45.27	10	13.25 ± 6.36	0.000
P		0.081		0.455	
GSTM1 polymorphism					
Negative (-)	34	50.06 ± 40.72	17	16.94 ± 9.86	< 0.001
Positive (+)	39	43.93 ± 24.55	16	19.14 ± 19.88	< 0.001
P		0.350		0.845	
CYP1A1/GSTM1					
A / -	8	50.96 ± 29.79	4	18.05 ± 12.32	0.073
A / +	16	31.51 ± 18.73	4	17.17 ± 10.90	0.249
BC / -	26	57.62 ± 43.92	13	16.59 ± 9.54	< 0.001
BC / +	23	52.58 ± 24.72	12	19.79 ± 22.46	0.001
P		0.083		0.956	

The difference of CYP1A1 and CYP1A1/GSTM1 polymorphism were calculated by Kruskal-Wallis H test, and the others were calculated by Wilcoxon rank sum test.

Table 11. The association between protein expressions of CYP1A1 and GSTM1 and DNA adduct levels.

Protein expression	DNA adduct /10 ⁸ nucleotides			P
	Low (n=22)	Medium (n=22)	High (n=20)	
CYP1A1				
-	8	10	9	
+	7	5	3	
++	7	6	2	
+++	0	2	6	0.036
GSTM1				
-	3	5	10	
+	2	1	0	
++	8	9	3	
+++	9	8	7	0.131

The protein expressions of CYP1A1 and GSTM1 were evaluated by immunohistochemistry, and the criteria of protein expression levels were described in text. Sixty-four lung specimen from 73 cases were available in this study.

The adduct levels of lung cancer patients were divided into three categories as follows:

Low: 15.85 ± 7.21 (2.4 – 29.27 adducts/10⁸ nucleotides)

Medium: 45.07 ± 10.73 (31.18 – 62.60 adducts/10⁸ nucleotides)

High: 89.06 ± 26.62 (64.46 – 147.09 adducts/10⁸ nucleotides)

The association between protein expressions of CYP1A1 and GSTM1 and DNA adduct levels was statistically analyzed by χ^2 test.

Table 12. Multivariate logistic regression analysis of lung cancer risk in association with DNA adduct level, age, gender, smoking status, and genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1.

Variables	Unfavorable (n)/favorable (n)	OR	95% CI	P
DNA adduct				
Level	> 48.66 (34)/ 48.66 (72)	25.19	2.99-211.99	0.003
Age		1.06	1.01-1.12	0.02
Sex	Male (31)/female (75)	0.95	0.24-3.69	0.94
Smoking status				
	Smoking (43)/non-smoking (60)	1.36	0.38-4.94	0.64
CYP1A1				
	Polymorphism B, C (74)/A (32)	0.72	0.38-1.37	0.32
GSTM1 Polymorphism				
	Positive (55)/negative (51)	1.64	0.55-4.90	0.38

Table 13. Correlation between gender and CYP1A1, GSTM1 genetic polymorphism of non-smoking lung cancer patients.

Gene	Gender		P
	Female (n=31)	Male (n=31)	
CYP1A1 polymorphism			
m1/m1 (A)	12	9	0.617
m1/m2 (B)	16	17	
m2/m2 (C)	3	5	
GST M1 polymorphism			
Negative (-)	12	13	1.000
Positive (+)	19	18	
CYP1A1/GSTM1			
A / -	11	10	0.504
A / +	17	16	
BC / -	1	4	
BC / +	2	1	

The association between genetic polymorphism of CYP1A1 and GSTM1 and gender were statistically analyzed by χ^2 test.

Table 14. The combination effects of CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms on DNA adduct levels of lung cancer patients.

CYP1A1/ GSTM1 Polymorphism	DNA adducts /10 ⁸ nucleotides							
	³² P-Postlabeling*				ELISA**			
	High	Low	OR	95%CI	High	Low	OR	95%CI
C/null	4 [#]	1	2.12	0.17-56.72	3	2	6.55	0.58-169.03
C/positive	3	0	1.29	0.21-8.36	2	1	2.73	0.54-14.47
A, B/null	18	2	2.82	0.41-23.94	14	6	1.71	0.41-7.28
A, B/positive	25	9	1.00		19	15	1.00	
			P = 0.54 for trend				P = 0.04 for trend	

*DNA adduct levels higher or lower than 15.0 adducts/10⁸ nucleotides as evaluated by ³²P-postlabeling was considered as high or low, respectively.

** Detectable or undetectable DNA adduct levels evaluated by ELISA were considered as high or low, respectively.

[#] Indicates the number of study subjects.

CYP1A1 genotypes: A, m1/m1; B, m1/m2; C, m2/m2.

OR: odd ratio

Table 15. The interaction effects between lung cancer and gender on the DNA adduct levels in entire study subjects.

Lung cancer/ Gender	DNA adducts /10 ⁸ nucleotides							
	³² P-Postlabeling*				ELISA**			
	High	Low	OR	95%CI	High	Low	OR	95%CI
LC/F	27 [#]	4	7.71	1.48-44.09	25	6	6.25	1.33-31.47
LC/M	23	8	3.29	0.76-14.82	13	18	1.08	0.26-4.56
NC/F	3	2	1.71	0.15-21.32	3	2	2.25	0.20-28.67
NC/M	7	8	1.00		6	9	1.00	
			P = 0.003 for trend				P = 0.01 for trend	

*DNA adduct levels higher or lower than 15.0 adducts/10⁸ nucleotides as evaluated by ³²P-postlabeling was considered as high or low, respectively.

**DNA adduct levels evaluated by ELISA as detectable or undetectable were considered as high or low, respectively.

[#] Indicates the number of study subjects.

LC/F, lung cancer/female; LC/M, lung cancer/male; NC/F, non-cancer/female; NC/male, non-cancer/male.

OR: odd ratio

Table 16. Relationships between p53 and MDM2 protein expressions and clinical pathological parameter of lung cancer patients.

Parameter	P53 IHC		Mdm2 IHC	
	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)
Gender				
Female (n=45)	39 (86.7)	6 (13.3)	17(37.8)	28 (62.2)
Male (n=92)	49 (53.3)	43 (46.7)	52(56.5)	40(43.5)
P	<0.0001		0.046	
Smoking habits				
No (n=75)	60 (80.0)	15 (20.0)	32 (42.7)	43 (57.3)
Yes (n=62)	28 (45.2)	34 (54.8)	37 (59.7)	25 (40.3)
P	<0.0001		0.059	
Tumor type				
AD (n=79)	63 (79.8)	16 (20.2)	41 (51.9)	38 (48.1)
SQ (n=58)	25 (43.1)	33 (56.9)	28 (48.3)	30 (51.7)
P	<0.0001		0.731	
Tumor stage				
I (n=44)	30 (68.2)	14 (31.8)	25 (56.8)	19 (43.8)
II (n=42)	23 (54.8)	19 (45.2)	19 (45.3)	23 (54.7)
III (n=51)	35 (68.7)	16 (31.3)	25 (49.0)	26 (51.0)
P	0.306		0.546	

χ^2 test was used for statistical analysis.

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinoma.

IHC: immunohistochemistry

Table 17. Comparison of p53, and MDM2 protein expression and mdm2 mRNA among lung cancer patients with different gender and smoking status.

Parameter	Non-smoking		Smoking	P
	Female (%)	Male (%)	male (%)	
P53 IHC				
Negative (n=88)	39 (86.7)	21 (70.0)	28 (45.2)	
Positive (n=49)	6 (13.3)	9 (30.0)	34 (54.8)	<0.0001
P	0.088	0.028		
MDM2 IHC				
Negative (n=69)	17 (37.8)	15 (50.0)	37 (59.7)	
Positive (n=68)	28 (62.2)	15 (50.0)	25 (40.3)	0.082
P	0.345	0.501		
P53/MDM2				
-/- (n=42)	16 (35.6)	8 (26.7)	18 (29.0)	
-/+ (n=46)	23 (51.1)	13 (43.3)	10 (16.1)	
+/- (n=27)	1 (2.2)	7 (23.3)	19 (30.6)	
+/+ (n=22)	5 (11.1)	2 (6.7)	15 (24.3)	<0.0001
P	0.031	0.021		
mdm2 mRNA				
	(n=34)(%)	(n=28)(%)	(n=40)(%)	
Negative (n=57)	23 (53.5)	14 (50.0)	20 (50.0)	
Positive (n=45)	11(46.5)	14 (50.0)	20 (50.0)	0.239
P	0.198	1.000		
P53 IHC/mdm2 mRNA				
-/- (n=40)	21 (61.7)	10 (35.7)	9 (22.5)	
-/+ (n=27)	10 (29.4)	10 (35.7)	7 (17.5)	
+/- (n=17)	2 (5.9)	4 (14.3)	11 (27.5)	
+/+ (n=18)	1(3.0)	4 (14.3)	13 (32.5)	<0.0001
P	0.111	0.082		

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 18. Relationships between Rb, P16, and Cyclin D protein expressions and clinical pathological parameter of lung cancer patients.

Parameter	Rb status		P16 status		Cyclin D1 status	
	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)
Gender						
Female (n=45)	43(95.6)	2(4.4)	37 (82.2)	8 (17.8)	33 (73.3)	12 (26.7)
Male (n=92)	69(75.0)	23(25.0)	69 (75.0)	23 (25.0)	63 (68.5)	29 (31.5)
P	0.004		0.391		0.692	
Smoking habits						
No (n=75)	71(94.7)	4(5.3)	59 (78.7)	16 (21.3)	56 (74.7)	19 (25.3)
Yes (n=62)	41(66.1)	21(33.9)	47 (75.8)	15 (24.2)	40 (64.5)	22 (35.5)
P	<0.0001		0.838		0.261	
Tumor type						
AD (n=79)	77(97.5)	2(2.5)	57 (72.2)	22 (27.8)	60 (75.9)	19 (24.1)
SQ (n=58)	35(60.3)	23(39.7)	49 (84.5)	9 (15.5)	36 (62.1)	22 (37.9)
P	<0.0001		0.101		0.091	
Tumor stage						
I (n=44)	37(84.1)	7(15.9)	32 (72.7)	12 (27.3)	28 (63.6)	16 (36.6)
II (n=42)	32(76.2)	10(23.8)	32 (76.2)	10 (23.8)	30 (71.4)	12 (28.6)
III (n=51)	43(84.3)	8(15.6)	42 (82.4)	9 (17.6)	38 (74.5)	13 (25.5)
P	0.534		0.522		0.500	

χ^2 test was used for statistical analysis.

AD: adenocarcinoma; SQ: squamous cell carcinoma.

Table 19. Comparison of P53, Mdm2, Rb, P16 and Cyclin D1 protein expression among lung cancer patients with different gender and smoking status.

Protein expression	Non-smoking		Smoking	P
	Female (%)	Male (%)	Male (%)	
Rb status				
Negative (n=112)	43 (95.6)	28 (93.3)	41 (66.1)	<0.0001
Positive (n=25)	2 (4.4)	2 (6.7)	21 (33.9)	
P	1.000	0.005		
P16 status				
Negative (n=106)	37 (82.2)	22 (73.3)	47 (75.8)	0.615
Positive (n=31)	8 (17.8)	8 (26.7)	15 (24.2)	
P value	0.398	0.802		
Cyclin D1 status				
Negative (n=96)	34 (68.9)	22 (73.3)	40 (64.5)	0.425
Positive (n=41)	11 (31.1)	8 (26.70)	22 (35.5)	
P	1.000	0.481		
Rb/P16 status				
-/- (n=88)	35 (77.8)	20 (66.7)	33 (53.2)	0.002
-/+ (n=24)	8 (17.8)	8 (26.7)	8 (12.9)	
+/- (n=18)	2 (4.4)	2 (6.6)	14 (22.5)	
+/+ (n=7)	0 (0)	0 (0)	7 (31.4)	
P	0.570	0.027		
Rb/ CyclinD1				
-/- (n=86)	33 (73.3)	22 (73.3)	31 (50.0)	0.001
-/+ (n=26)	10 (22.2)	6 (20.1)	10 (12.9)	
+/- (n=10)	0 (0)	1 (3.3)	9 (16.1)	
+/+ (n=15)	2 (4.5)	1 (3.3)	12 (19.4)	
P	0.587	0.044		

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 20. Characteristics of study subjects in this study.

Parameter	Lung cancer (n=141)	Non-cancer (n=60)	P
Age (years±SEM)	63.02±9.61	49.95±15.14	<0.001
Gender			
Female	45 (31.9)	11 (18.3)	
Male	96 (68.1)	49 (81.7)	0.059
Smoking status			
No	78 (55.3)	48 (80.0)	
Yes	63 (44.7)	12 (20.0)	0.001
Tumor type			
AD	83 (58.9)	-	
SQ	58 (41.1)	-	-
Tumor stage			
I	46 (32.6)	-	
II	42 (29.8)	-	
III	53 (37.6)	-	-

The difference of age between lung cancer and non-lung cancer patients was calculated by the Wilcoxon rank sums test. The other status differences between lung cancer and non-lung cancer patients were calculated by the χ^2 test.

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinoma.

Table 21. Comparison of HPV 16/18 DNA detection results between nested PCR and ISH methods.

Nested PCR	ISH		Concordance %*
	Negative	Positive	
HPV 16			
Negative	83	8	
Positive	30	20	73.0
HPV 18			
Negative	74	9	
Positive	11	47	85.8

This study was only done on sections of lung cancer patients since no paraffin sections of lung tissues from non-cancer patients were available.

*Concordance % = (Number of patients with the same HPV DNA detection result by both methods) / (number of total patients) x 100.

Table 22. The differences of HPV infection between lung cancer and non-cancer patients with different gender and smoking habits.

Parameter	Lung cancer		Non-cancer		P
	Negative	Positive	Negative	Positive	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
HPV 16					
Gender					
Female	18 (40.0)	27 (60.0)	9 (81.8)	2 (18.2)	0.031
Male	73 (76.0)	23 (24.0)	42 (85.7)	7 (14.3)	0.253
P	0.00007		0.664		
Smoking					
No	40 (51.3)	38 (48.7)	41 (85.4)	7 (14.6)	0.0002
Yes	51 (81.0)	12 (29.0)	10 (83.3)	2 (16.7)	1.0
P	0.0005		1.0		
HPV18					
Gender					
Female	12 (26.7)	33 (73.3)	10 (90.9)	1 (9.1)	0.0002
Male	71 (74.0)	25 (26.0)	43 (87.8)	6 (12.2)	0.089
P	0.0000003		1.0		
Smoking					
No	33 (42.3)	45 (57.3)	42 (87.5)	6 (12.5)	<0.000001
Yes	50 (79.4)	13 (20.6)	11 (91.7)	1 (8.3)	0.444
P	0.00002		1.0		

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 23. Associations between the presence of HPV 16/18 DNA and clinico-pathological parameters.

Parameter	HPV16		HPV18	
	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)
Tumor type				
AD (n=83)	47 (56.6)	36 (43.4)	42 (50.6)	41 (49.4)
SQ (n=58)	44 (75.9)	14 (24.1)	41 (70.7)	17 (29.3)
P	0.030		0.027	
Tumor stage				
I (n=46)	26 (56.5)	20 (43.5)	26 (56.5)	20 (43.5)
II (n=42)	34 (81.0)	8 (19.0)	27 (64.3)	15 (35.7)
III (n=53)	31 (58.5)	22 (41.5)	30 (56.6)	23 (43.4)
P	0.029		0.696	
T factor				
1 (n=10)	9 (90.0)	1 (10.0)	7 (70.0)	3 (30.0)
2 (n=91)	73 (80.2)	18 (19.8)	56 (61.5)	35 (38.5)
3 (n=30)	25 (83.3)	5 (16.7)	18 (60.0)	12 (40.0)
4 (n=10)	6 (60.0)	4 (40.0)	4 (40.0)	6 (60.0)
P	0.691		0.544	
N factor				
0 (n=65)	50 (76.9)	15 (33.1)	40 (61.5)	25 (38.5)
1 (n=34)	29 (85.3)	5 (14.7)	20 (58.8)	14 (41.2)
2 (n=41)	33 (80.5)	8 (19.5)	24 (58.5)	17 (41.5)
3 (n=1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
P	0.768		0.691	

The HPV 16/18 DNA detection was performed by nested PCR.

χ^2 test was used for statistically analysis.

AD: adenocarcinoma; SQ: squamous cell carcinoma.

Table 24. Odds ratio of the presence of HPV in tumor tissues from lung cancer patients according to gender and smoking status.

Gender		HPV16		HPV18	
		OR (95% CI)	AOR (95% CI)	OR (95% CI)	AOR (95% CI)
Male	Yes	1	11	1	
Male	No	2.13 (0.81-5.54)	1.77 (0.48-6.50)	2.20 (0.86-5.60)	2.30 (0.61-8.68)
Female	No	6.38(2.68-15.17)	3.98(1.13-13.98)	10.58(4.30-26.0)	11.66(2.94-46.27)

AOR: odds ratio after being adjusted for age, tumor type and tumor stage.

Table 25. Correlation between HPV 6 DNA infection in lung tumor tissues and clinical parameter.

Parameter	HPV 6		P
	Negative (%)	Positive (%)	
Gender			
Female (n=45)	40 (88.9)	5 (11.1)	0.002
Male (n=96)	61 (66.3)	35 (33.7)	
Smoking habits			
No (n=77)	62 (80.5)	15 (17.3)	0.014
Yes (n=64)	39 (60.9)	25 (39.1)	
Tumor type			
AD (n=79)	60 (72.2)	23 (27.8)	0.851
SQ (n=58)	41 (70.7)	17 (29.3)	
Tumor stage			
I (n=44)	29 (63.0)	17 (37.0)	0.062
II (n=42)	28 (66.7)	14 (33.3)	
III (n=51)	44 (83.0)	9 (17.0)	
T factor			
1 (n=9)	7 (70.0)	3 (30.0)	0.995
2 (n=91)	65 (71.4)	26 (28.6)	
3 (n=29)	22 (73.3)	8 (26.7)	
4 (n=9)	7 (70.0)	3 (30.0)	
N factor			
0 (n=62)	41 (63.1)	24 (36.9)	0.065
1 (n=34)	24 (70.6)	10 (29.4)	
2 (n=40)	35 (85.4)	6 (14.6)	
3 (n=1)	1 (100)	0 (0)	

Table 26. HPV 6/11 and HPV 16/18 infection in lung cancer patients with different gender and smoking status.

	Non-smoking		Smoking	P

	Female	Male	Male	
	(%)	(%)	(%)	
HPV6				
Negative (n=101)	40 (88.9)	22 (66.7)	39 (61.9)	
Positive (n=40)	5 (11.1)	11 (33.3)	24 (38.1)	0.007
P	0.023	0.824		
HPV16				
Negative (n=91)	18 (40.0)	22 (66.7)	51 (80.9)	
Positive (n=50)	27 (60.0)	11 (33.3)	12 (19.1)	<0.0001
P	0.024	0.137		
HPV18				
Negative (n=83)	12 (26.7)	21 (63.6)	50 (79.4)	
Positive (n=58)	33 (73.3)	12 (36.4)	13 (20.6)	<0.0001
P	0.001	0.141		

χ^2 test was used for statistically analysis.

The HPV 6/11/16/18 DNA detection was performed by type-specific nested PCR.

Table 27. The association between HPV infection and clinical parameters in smoking and non-smoking lung cancer patients.

Parameter	HPV6		HPV16		HPV18	
	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Non-smoker						
Tumor type						
AD (n=62)	49	13	30	32	26	36
SQ (n=16)	13	3	10	6	7	9
P	1.000		0.404		1.000	
Tumor stage						
I (n=29)	23	6	13	16	12	17
II (n=16)	12	4	12	4	8	8
III (n=33)	27	6	15	18	13	20
P	0.805		0.104		0.774	
Smoker						
Tumor type						
AD (n=21)	11	10	17	4	16	5
SQ (n=42)	28	14	34	8	34	8
P	0.287		1.000		0.745	
Tumor stage						
I (n=17)	6	11	13	4	14	3
II (n=26)	16	10	22	4	19	7
III (n=20)	17	3	16	4	17	3
P	0.008		0.795		0.576	

Table 28. Correlation between HPV DNA and E6/E7 mRNA expression.

HPV 16/18 DNA	HPV 16/18			
	E6 mRNA		E7 mRNA	
	Negative	Positive	Negative	Positive
HPV 16	(n=112)	(n=25)	(n=119)	(n=18)
Negative (n=91)	91	0	91	0
Positive (n=46)	21	25	28	18
P value	<0.0001		<0.0001	
HPV 18	(n=120)	(n=27)	(n=113)	(n=24)
Negative (n=83)	83	0	83	0
Positive (n=54)	27	27	30	24
P value	<0.0001		<0.0001	

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 29. Correlation between HPV 16/18 E6 mRNA expression and clinical parameters in lung cancer.

Parameter	HPV 16		HPV 18	
	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)
Gender				
Female (n=45)	28 (62.2)	17 (37.8)	28 (62.2)	17 (37.8)
Male (n=92)	84 (91.3)	8 (8.7)	82 (89.1)	10 (10.9)
P	< 0.0001		< 0.0001	
Smoking habits				
No (n=75)	56 (74.7)	19 (25.3)	54 (72.0)	21 (28.0)
Yes (n=62)	56 (90.3)	6 (9.7)	56 (90.3)	6 (9.7)
P	0.016		0.009	
Tumor type				
AD (n=79)	62 (78.5)	17 (21.5)	60 (75.9)	19 (24.1)
SQ (n=58)	50 (86.2)	8 (13.8)	50 (86.2)	8 (13.8)
P	0.272		0.192	
Tumor stage				
I (n=44)	34 (77.3)	10 (22.3)	34 (77.3)	10 (22.7)
II (n=42)	38 (90.5)	4 (9.5)	35 (83.3)	7 (16.7)
III (n=51)	40 (78.4)	11 (21.6)	41 (80.4)	10 (19.6)
P	0.211		0.779	
T factor				
1 (n=9)	8 (88.9)	1 (11.1)	6 (66.7)	3 (33.3)
2 (n=91)	70 (76.9)	21 (23.1)	75 (82.4)	16 (17.6)
3 (n=29)	28 (96.6)	1 (3.4)	22 (75.8)	7 (24.2)
4 (n=9)	6 (66.7)	3 (33.3)	7 (77.8)	2 (22.2)
P	0.008		0.855	
N factor				
0 (n=62)	50 (80.6)	12 (19.4)	48 (77.4)	14 (22.6)
1 (n=34)	30 (88.2)	4 (11.8)	29 (85.3)	5 (14.7)
2 (n=40)	31 (77.5)	9 (22.5)	32 (80.0)	8 (20.0)
3 (n=1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
P	0.577		0.722	

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous-cell carcinoma.

Table 30. Correlation between HPV 16/18 E7 mRNA expression and clinical parameters in lung cancer patient tumor tissues analyzed by in situ RT-PCR.

Parameter	HPV 16		HPV 18	
	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)
Gender				
Female (n=45)	34 (75.6)	11 (24.4)	28 (62.2)	17 (37.8)
Male (n=92)	85 (92.4)	7 (7.6)	85 (92.4)	7 (7.6)
P	0.0013		0.0001	
Smoking habits				
No (n=75)	62 (82.7)	13 (17.3)	55 (73.3)	20 (26.7)
Yes (n=62)	57 (90.5)	5 (9.5)	58 (92.4)	4 (7.6)
P	0.132		0.003	
Tumor type				
AD (n=79)	68 (86.1)	11 (13.9)	63 (79.7)	16 (20.3)
SQ (n=58)	51 (87.9)	7 (12.1)	50 (86.2)	8 (13.8)
P	0.803		0.192	
Tumor stage				
I (n=44)	36 (81.8)	8 (18.2)	35 (79.5)	9 (20.5)
II (n=42)	38 (90.5)	4 (9.5)	37 (88.1)	5 (11.9)
III (n=51)	45 (88.2)	6 (11.8)	41 (80.4)	10 (19.6)
P	0.462		0.514	
T factor				
1 (n=9)	5 (62.5)	3 (37.5)	3 (37.5)	5 (62.5)
2 (n=91)	79 (86.8)	12 (13.2)	77 (84.6)	14 (15.4)
3 (n=29)	27 (93.1)	2 (6.9)	26 (89.7)	3 (20.3)
4 (n=9)	8 (88.9)	1 (10.1)	7 (77.8)	2 (22.2)
P	0.159		0.005	
N factor				
0 (n=62)	51 (82.3)	11 (17.7)	51 (82.3)	11 (17.7)
1 (n=34)	31 (88.2)	3 (11.8)	29 (85.3)	5 (14.7)
2 (n=40)	36 (90.0)	4 (10.0)	32 (80.0)	8 (20.0)
3 (n=1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
P	0.508		0.903	

Table 31. The differences of HPV16/18 E6/E7 mRNA expression in lung cancer patients with different gender and smoking habits.

HPV16/18 E6/E7	Non-smoking		Smoking	P
	Female (n=45)(%)	Male (n=30)(%)	Male (n=62)(%)	
HPV16				
E6 mRNA				
Negative (n=112)	28(62.0)	28(93.7)	56(90.3)	<0.001
Positive (n=25)	17(38.0)	2(6.3)	6(9.7)	
P	0.003	1.000		
E7 mRNA				
Negative (n=119)	34 (76.0)	28 (93.3)	57 (91.9)	0.027
Positive (n=18)	11(24.0)	2(6.7)	5(8.1)	
P	0.034	1.000		
HPV18				
E6 mRNA				
Negative (n=110)	28 (62.0)	26 (87.0)	56 (90.3)	0.001
Positive (n=27)	17 (38.0)	4 (13.0)	6 (9.7)	
P	0.063	0.723		
E7 mRNA				
Negative (n=113)	28 (62.0)	27 (90.0)	58 (93.5)	<0.001
Positive (n=24)	17 (38.0)	3 (10.0)	4 (6.5)	
P	0.008	0.679		

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 32. The differences of HPV16/18 E6 and p53 status, HPV16/18 E7 and Rb status in lung cancer patients with different gender and smoking habits.

Parameter	Non-smoking		Smoking	P
	Female (%)	Male (%)	Male (%)	
E6/P53				
HPV16				
-/- (n=67)	22 (48.9)	20 (66.7)	25 (40.32)	
-/+ (n=41)	7 (15.6)	6 (20.0)	28 (45.16)	
+/- (n=25)	16 (35.5)	3 (10.0)	6 (9.7)	
+/+ (n=4)	0 (0)	1 (3.3)	3 (4.82)	<0.0001
P	0.04	0.082		
HPV18				
-/- (n=69)	23 (51.1)	19 (63.3)	27 (43.5)	
-/+ (n=41)	5 (11.1)	7 (23.3)	29 (47.8)	
+/- (n=19)	16 (35.6)	2 (6.7)	1 (1.6)	
+/+ (n=8)	1 (2.2)	2 (6.7)	5 (7.1)	<0.0001
P	0.015	0.105		
E7/Rb				
HPV16				
-/- (n=72)	17 (37.8)	20 (66.7)	35 (56.5)	
-/+ (n=19)	1 (2.2)	2 (6.7)	16 (25.8)	
+/- (n=40)	26 (57.8)	8 (26.6)	6 (9.7)	
+/+ (n=6)	1 (2.2)	0 (0)	5 (8.0)	<0.0001
P	0.030	0.006		
HPV18				
-/- (n=67)	12 (26.7)	20 (66.7)	35 (56.5)	
-/+(n=16)	0 (0)	1 (3.3)	15 (24.1)	
+/- (n=45)	31 (68.9)	8 (26.7)	6 (9.7)	
+/+ (n=9)	2 (4.4)	1 (3.3)	6 (9.7)	<0.0001
P	0.002	0.008		

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 33. Correlation between p53 codon 72 polymorphism and HPV infection in lung cancer patient.

HPV 16/18	p53 codon 72 polymorphism			P
	Arg/Arg (n=45)	Arg/Pro (n=72)	Pro/Pro (n=20)	
HPV 16				
Negative (n=91)	31	45	15	0.527
Positive (n=46)	14	27	5	
HPV 18				
Negative (n=83)	19	48	16	0.005
Positive (n=54)	26	24	4	

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 34. Effect of p53 codon 72 polymorphism in p53 protein inactivation by HPV16/18 E6 in lung cancer patient' s tumor tissues.

HPV E6 / P53	p53 codon72 polymorphism			P value
	Arg/Arg (n=45)	Arg/Pro (n=72)	Pro/Pro (n=20)	
HPV16				
-/- (n=67)	22	36	9	
-/+ (n=41)	15	20	6	
+/- (n=25)	7	14	4	
+/+ (n=4)	1	2	1	0.987
HPV18				
-/- (n=69)	21	37	11	
-/+ (n=41)	12	22	7	
+/- (n=19)	7	11	1	
+/+ (n=9)	5	2	1	0.493

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 35. Univariate analysis of influences of clinical characteristics on overall survival duration of lung cancer patients.

Prognostic factor	No.	Medium Survival (days)	3-Year survival (%)	Log-rank (P)
HPV 16E6/E7/P53/Rb				
-/-/±/±	86	612	54.46	0.0817
+/-/-/-	39	561	41.86	
Gender				
Female	44	612	50.65	0.1498
Male	81	535	42.46	
Tumor type				
AD	76	524	43.59	0.5646
SQ	49	692	48.98	
Tumor stage				
I	41	764	79.30	< 0.0001
II	37	510	44.81	
III	47	401	19.21	
T factor				
1	7	638	50.00	0.2613
2	85	612	50.16	
3	25	401	36.27	
4	8	625	37.50	
N factor				
0	58	785	69.02	<0.001
1	27	511	32.95	
2	39	401	21.85	
3	1	448	0	

AD: adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinoma.

Table 36. Comparison of pack years and total aromatic DNA adduct levels in normal lung tissues of smoker from various countries.

No. of patients	Pack year	DNA adducts /10 ⁸ nucleotides	References
17	38.63±18.63	11.12±7.53	Phillips et al., 1988
21	50.78±21.76	4.65±6.50	Geneste et al., 1991
13	50.08±25.87	5.60±3.46	Alexandron et al., 1992
38	42.00±20.20	9.75±7.86	Ryberg et al., 1994
93	16.50±7.40	12.08±8.14	Mollerup et al., 1999
32	10.69±13.40	48.30±38.27	Cheng et al., 2001

Table 37. The BaP-like DNA adduct levels (BPDE) in lung tissues from lung cancer patients living at Taichung, Taitung and Kaohsiung.

BPDE IHC	Taichung (n=29)	Taitung (n=16)	Kaohsiung (n=19)	P
- (0%)	13	8	2	
+ (<10%)	6	3	3	
++ (10-50%)	0	4	10	
+++ (>50%)	10	1	4	<0.001

The BaP-like DNA adduct levels were evaluated by immunohistochemistry.

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 38. Codon 12 mutation of k-ras gene in lung cancer patients' tumor tissues.

Patient No.	Sex	Smoking	Tumor type	Tumor stage	T	N	M	P53 mutation	K-ras mutation
1012587I	M	1.10	E	I	2	0	0	-	+
53654J	M	1.10	A	I	2	0	0	-	+
788086G	M	1.46	A	II	3	0	0	-	+
959745J	M	0.91	A	II	3	0	0	-	+
102736H	M	0.73	E	II	3	0	0	-	+

Table 39. Literature review of k-ras mutation rate in lung cancer.

Authors	No.	Mutation frequency (%)	Site (codon) (%)	Tumor type (%)
Keohavong et al., 2001	48	26.3	9, 11, 12	AD (26.3) SQ (0)
Dai et al., 2000	16	6.25	9	AD (6.25)
Graziano et al., 1999	213	16.4	12	AD (29.0) SQ (1.6) AS (10.0) LC (12.8)
Keohavong et al., 1996	173	25.4	12	AD (32.3) SQ (2.7) AS (11.1)
Kirsti et al., 1999	97	21	12, 13, 61	unknown
Wang et al., 1998	84	6.0	12, 13, 68or 69	AD (8.1) SQ (2.6) AS (20.0)
Cooper et al., 1997	65	16	12	AD (16)
Vachtenheim et al., 1995	137	<1%	12, 13	AD (47.1) SQ (7.6)
Present study	173	2.9	12	AD (1.0) SQ (0.8)

8. 英文摘要

Lung cancer has been the leading and second cause of cancer death of women and men, respectively, in Taiwan since 1982 and is responsible for about 20% of overall cancer death. Similar trend was also observed in western countries and Japan. Prevention of lung cancer incidence is an important study topic in human health not only in Taiwan, but also worldwide. Cigarette smoking has been implied to be the most important etiological factor of lung cancer and up to 90% of lung cancer in the western countries could be explained by cigarette smoking. Intriguingly, in Taiwan, only around 50% of lung cancer incidence could be related to cigarette smoking, particularly, less than 10% of Taiwanese female lung cancer patients are smokers. Thus, it is conceivable that environmental factors other than cigarette smoking may be associated with lung cancer development in Taiwan and the aim of this study, therefore, is to evaluate possible involved environmental factors, including exposure to environmental carcinogen and microbial infections.

It has been well known that benzo[a]pyrene (BaP), one polycyclic aromatic hydrocarbon, is converted into a active metabolite, which will attack DNA to form DNA adduct, through biotransformation. The DNA adduct has been shown to result in mutation on tumor suppressor genes or oncogenes and ultimately, lead to formation of tumor. To prove the feasibility of DNA adduct levels in lung tissues being a risk biomarker of lung cancer, we have to firstly evaluate if DNA adduct levels in lung tissues of lung cancer patients are higher than that of normal controls. In this study, 73 lung cancer patients and 33 non-cancer control

were recruited and corresponding DNA adduct levels were analyzed by ^{32}P -postlabeling. Our data showed that DNA adduct levels in lung cancer patients' non-tumor tissues (49.58 ± 33.39 adducts/ 10^8 nucleotides) were significantly higher than that of non-cancer controls (18.00 ± 15.33 adducts/ 10^8 nucleotides, $P < 0.001$). And DNA adduct levels in smoking lung cancer patients (49.03 ± 37.21 adducts/ 10^8 nucleotides) were similar to that of non-smoking ones (49.28 ± 30.73 adducts/ 10^8 nucleotides, $P = 0.719$). The DNA adduct levels were irrelevant to genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1, but related to the CYP1A1 protein expression. The data showed that exposure to environmental carcinogens may play an important role in lung cancer formation other than cigarette smoking. Multivariate logistic regression analysis showed that individuals with higher DNA adduct levels (> 48.66 adducts/ 10^8 nucleotides) had an approximate 25-fold risk of lung cancer compared to that of those with low adduct levels (≤ 48.66 adducts/ 10^8 nucleotides). The other factor such as gender, smoking behavior, or genetic polymorphism of CYP1A1 and GSTM1 all could not be risk biomarkers for lung cancer.

From previous reports, women have been mostly believed to be more susceptible to cigarette smoking. To evaluate whether non-smoking female have higher susceptibility to the environmental carcinogen exposure, DNA adduct levels of non-smoking lung cancer patients, including 30 female and 30 male, and 20 non-smoking non cancer controls were analyzed by ^{32}P -postlabeling and ELISA. Our data suggested that lung cancer patients were indeed more susceptible to the environmental carcinogen exposure than non-cancer controls and DNA adduct levels of female lung cancer patients were actually higher than that of male. Furthermore, this difference in DNA adduct levels was not resulted from genetic

polymorphism or protein expression of CYP1A1 and GSTM1. Therefore, high susceptibility to DNA damage of females may be partial responsible for the high mortality rate of lung cancer in non-smoking Taiwanese women.

Based on the higher DNA adduct levels in female lung cancer patients in Taiwan, it was suspected that mutation frequencies of p53 and k-ras gene were higher in such patients. From our preliminary data, it was showed that only 2 of 52 female have mutations occurred in p53 gene, which yielding a mutation frequency of 3.9% and there was no K-ras mutation in tumor tissues of female lung cancer patients being detected. However, by immunohistochemistry, p53 and Rb protein expression could not been detected in most lung cancer patients. Meanwhile, the inactivation of the P53 and Rb protein could not be explained by their regulated gene such as MDM2, p16 and cyclinD1. From all these, we, therefore suspected that other biological factors may be responsible for the inactivation of p53 and Rb and therefore involved in lung tumorigenesis in Taiwan.

Since the p53 and Rb protein could be inactivated by the E6 and E7 oncoproteins encoded by human papillomavirus 16/18 (HPV 16/18) we hypothesized that the HPV may be involved in P53 and Rb protein inactivation in lung tumor tissues. In this study, 141 lung cancer patient and 60 non-cancer control were recruited to evaluate the infection rate of low-risk (HPV 6/11) and high-risk HPV (HPV 16/18) by nested PCR and *in situ* hybridization, to determine the difference in the infection rate of HPV between lung cancer patients and non-cancer controls. The infection rate of HPV6, 11, 16 and 18 for lung cancer patients was 28.4%, 10.0%, 35.5% and 41.1%, respectively, and the difference in prevalence rates of 6, 16 and 18 between these two study groups were statistically different. Therefore, the infection of HPV 6, 16 and 18 may be involved in lung cancer development.

When stratified by gender and smoking behavior, HPV 16/18 infection rate of non-smoking female lung cancer patients (60.0% and 73.0% for HPV 16 and 18, respectively) were significantly higher than that of man (24.0% and 26.0% for HPV 16 and 18, respectively). But for HPV6, the highest infection rate of HPV6 was in smoking male (38.1%) and the lowest was in non-smoking female (11.1%). The result suggested that the different type of HPV might be involved in lung cancer with different gender and smoking behavior while the infection of HPV 16/18 may be involved in female lung cancer formation in Taiwan. It was also found that the infection rates of HPV 6 and HPV 16 were correlated with tumor stage, with the highest frequency being for stage I patients, therefore, HPV infection may contribute in the early stage in lung cancer development. To understand whether the inactivation of P53 and Rb in lung tumor tissues were correlated with HPV16/18 E6/E7, the HPV16/18 E6/E7 mRNA expression in lung tumor tissue were detected by *in situ* RT-PCR. In the serial tissue sections, the p53 and Rb protein were not detected in 80% of the lung cancer patients with HPV16/18 E6/E7 mRNA positive expression and these patients have the poor prognosis. Because of these, inactivation of p53 and Rb protein by HPV16/18 E6/E7 may be linked in lung tumorigenesis.

In conclusion, the concurrence of high DNA damage susceptibility to environmental carcinogen exposure and high HPV16/18 infection may contribute to the higher mortality rate of non-smoking female lung cancer in Taiwan.