

R
008.8
0006
91

中山醫學大學毒理學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Toxicology,
Chung Shan Medical University

指導教授：李 輝 博士 (Huei Lee, Ph. D.)

邱慧玲 博士 (Hui Ling Chiou, Ph. D.)

台灣肺癌患者人類乳突瘤病毒 16/18

之可能感染路徑之研究



The possible infection route of human papillomavirus 16/18
in Taiwanese lung cancer patients

研究生：廖育晴 (Yu-Ching Liaw) 撰

中華民國九十一年六月

(June, 2002)

參考用書恕不外借

中山醫學大學圖書館



C071697

博碩士論文電子檔案上網授權書

(提供授權人裝釘於紙本論文書名頁之次頁用)

本授權書所授權之論文為授權人在中山醫學大學毒理學研究所 90 學年度第二學期取得碩士學位之論文。

論文題目：台灣肺癌患者人類乳突瘤病毒 16/18 之可能感染路徑之研究

指導教授：李輝博士、邱慧玲博士

茲同意將授權人擁有著作權之上列論文全文（含摘要），非專屬、無償授權國家圖書館及本人畢業學校圖書館，不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或其他各種數位化方式將上列論文重製，並得將數位化之上列論文及論文電子檔以上載網路方式，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

- 讀者基於非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法相關規定辦理。

授權人：**廖育晴**

簽名：廖育晴 中華民國 91 年 7 月 2 日

本論文為中山醫學大學授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中央研究院生醫所教授

沈志陽

沈志陽

國防醫學院微免所教授

陳小梨

陳小梨

中山醫學大學醫事技術學系副教授

張懿欣

張懿欣

中山醫學大學醫事技術學系助理教授
(論文共同指導教授)

邱慧玲

邱慧玲

中山醫學大學毒理學研究所教授

李輝

(論文指導教授)

李輝


中華民國九十一年六月

學生廖育晴論文題目為「台灣肺癌患者人類乳突瘤病毒 16/18 之可能感染路徑之研究」，其論文已經中山醫學大學醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 李輝

簽名：

邱慧玲

簽名：

中華民國九十一年六月

謝 誌

在二年的研究生涯中，感謝大家的指導與關愛。首先感謝恩師 李輝教授不論在研究方面或在做人處事之諄諄教誨，都讓我受益良多，並提供完善的環境與材料設施，也使我深深地感受到研究工作的重要性。感謝恩師 邱慧玲 助理教授，從大學至碩士班，引領我走進浩瀚的研究領域。不論在日常生活上的關心或研究上的指導，皆使我受益匪淺。撰寫論文期間，更感謝兩位恩師不辭辛勞、犧牲假期，對論文的架構及內容悉心斧正，在此致上最高的敬意與謝意。

文稿初成，復蒙國防醫學院微免所陳小梨教授、中央研究院生醫所沈志陽教授及本校醫技系張懿欣副教授撥冗審閱，對本論文悉心審查、詳加斧正，並提供諸多寶貴之意見，使本論文得以更臻完善，在此致上誠摯的謝意。兩年的研究生活，感謝許國堂老師、柯俊良老師、蔡菁華老師、林嬪嬪老師、吳文俊老師及張耀仁老師在課業及實驗上的指導與協助。同時感謝邊老師在日常生活的關心與問候，一切銘感於心。

感謝台中榮總胸腔外科陳志毅主任及中山醫學大學胸腔內科吳銘芳醫師在研究檢體上的提供，更感謝曉琪學姊不厭其煩地幫我收集檢體及整理資料，使研究得以順利進行。

特別感謝雅文學姐兩年來在實驗上不遺餘力指導及生活上的照

料，同時感謝吉慶學長在實驗上的幫忙，以及平時的包容與關照，更感謝文斌在我撰寫論文時，幫我收集檢體，及在深夜時護送我回家，感謝你們對我的付出。另感謝淑媛學姊、怡慧學姊、恆祥、孝誠、宏德、文啟、佳云、玉玲及牟小姐，感謝你們熱心協助使論文順利完成。感謝一起奮鬥兩年同窗伙伴慈華、文志、政桐、華偉、惠玲、惠足、宗伯、建皇、世偉及敏智的幫忙與鼓勵。更感謝昭仁兩年來的支持與鼓勵，使我能心無旁騖專注於研究工作，感激之心，無法言述。

最後僅以此文獻給一直在背後默默奉獻的家人，父母親辛苦的栽培與姐姐、哥哥及弟弟的支持與鼓勵，讓我能安心地完成學業，由衷地感謝您們為我所做的一切。最後，僅以此謝誌感謝一路與我相伴相隨的家人、師長及朋友們。

廖育晴 謹誌於

中山醫學大學毒理所

中華民國九十一年七月

目 錄

壹、中文摘要	1
貳、文獻綜論	4
一、肺癌之流行病學與致癌機轉	4
1. 肺癌之流行病學	4
2. 與肺癌形成有關之環境因子	5
3. 肺癌形成之分子機轉	8
二、人類乳突瘤病毒與其感染路徑	10
1. 人類乳突瘤病毒	10
2. 人類乳突瘤病毒感染路徑	16
三、人類乳突瘤病毒在人類腫瘤之研究	18
1. 人類乳突瘤病毒與人類腫瘤形成之相關性	18
2. 人類乳突瘤病毒與肺癌形成之相關性	19
參、研究動機	21
肆、材料與方法	23
一、檢體收集	23
二、材料與藥品	23
三、實驗方法	24
1. 肺癌患者血液檢體之 DNA 萃取	24

2. 肺癌患者腫瘤組織樣本之 DNA 萃取	25
3. 女性肺癌患者子宮頸抹片之 DNA 萃取	26
4. 血球及腫瘤組織 HPV DNA 之測定	26
5. 肺癌患者血液檢體之 RNA 萃取及純化	27
6. 反轉錄聚合酶連鎖反應	29
7. 定序分析	30
8. 統計分析	31
伍、結果	32
一、以 nested-PCR 偵測 HPV 16/18 DNA 之可信度實驗	32
二、肺癌患者與非癌症控制組血球中高危險型 HPV16/18 感染之比較	33
三、血球中高危險型 HPV 感染與臨床因子的相關性	33
四、HPV 感染做為肺癌的危險生物指標之多變項統計分析	34
五、肺癌患者肺腫瘤組織中 HPV 的傳染路徑	35
六、肺癌患者血球中高危險型 HPV DNA 及 E6 mRNA 表現的相關性	38
陸、討論	39
一、血液循環中 HPV 的感染	39
二、比較不同偵測 HPV 的方法	41

三、血球中 HPV 16 感染與腫瘤形式及腫瘤期別之相關性	43
四、肺癌患者 HPV 感染之可能路徑	44
五、血球中 HPV 感染與肺癌之相關性	46
六、結論	49
柒、參考文獻	50
捌、表與圖	68
玖、英文摘要	95

ABBREVIATION

Benzo[a] pyrene	Bap
Cervical intraepithelial neoplasia	CIN
Cyclin-dependent kinase	CDK
Complementary DNA	cDNA
Diethyl pyrocarbonate	DEPC
DL-Dithiothreitol	DTT
E6-associated protein	E6AP
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
Ethylenedinitrilo, tetra-acetic, disodium salt	EDTA
Human papillomavirus	HPV
Murine double minute 2	mdm2
Non-small cell lung cancer	NSCLC
Phosphate buffered saline	PBS
Polycyclic aromatic hydrocarbons	PAHs
Small cell lung cancer	SCLC
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Reverse transcription polymerase chain reaction	RT-PCR
<i>In situ</i> polymerase chain reaction	ISPCR
Long control region	LCR

壹、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癌症死亡原因。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。由本研究室先前研究發現，HPV 16/18 感染和不抽菸台灣女性肺癌形成有關 (Cheng et al., 2001)。最近又發現，在肺癌病患肺腫瘤組織切片上的血球抹片上可測得 HPV DNA。本研究擬探討台灣女性肺癌患者 HPV 的感染路徑，以及評估血液循環中之血球中 HPV DNA 存在，是否可做為罹患肺癌之危險指標。因此本研究選取 149 位肺癌患者及 175 位非癌症的成人，以 nested-PCR 分析血球中 HPV 的感染率，發現肺癌患者血球中 HPV 16/18 感染率均高於非癌症患者 (HPV 16, 52.4% vs. 12.6%, $P < 0.0001$; HPV 18, 30.9% vs. 5.1%, $P < 0.0001$)。由多變項統計分析的結果顯示，參與肺癌之危險因子中，以同時感染 HPV 16/18 者比未感染者罹患肺癌之危險性高 38.52 倍 ($P = 0.0004$)。而在 HPV 16 及 HPV 18 單獨感染方面，感染者比未感染者分別有 6.51 倍 ($P < 0.0001$) 及 9.23 倍 ($P < 0.0001$) 罹患肺癌之危險性。由此顯示血球中有 HPV 16/18 DNA 的感染可做為罹患肺癌的危險指標。為了進一步了解肺腫瘤組織中

之 HPV 的感染路徑？由先前研究已知 HPV 會感染於血球，且子宮頸是 HPV 的主要標的器官，因此假設女性肺癌患者肺臟組織中 HPV，可能是由子宮頸感染，再經由血液循環而感染至肺組織。本研究收集 149 位肺癌患者血液檢體中，有 70 位肺癌患者同時收集到外科手術取得之肺腫瘤組織，以 nested-PCR 分析其 HPV 的感染率，發現有 70% (49 of 70) 的肺癌患者其血球及肺組織都有 HPV 16 的感染，其間具有統計上的相關性 ($P = 0.001$) ($P < 0.05$ 即具有統計上的相關性)。其中僅有 51.4% 的肺癌患者血球及肺腫瘤組織之 HPV 18 感染有一致性，但卻未達到統計上之相關性 ($P = 0.096$)。由以上結果推測，HPV 16 較 HPV 18 有可能經由血球感染至肺臟。本研究至今僅收集到 59 位女性肺癌患者中的 15 位患者之子宮頸抹片能與血球中 HPV 的感染做一比較，結果發現有 86.7% 的女性肺癌患者之血球及子宮頸抹片 HPV 感染具有相關性 ($P = 0.022$)。其中沒有任何一個子宮頸抹片檢體偵測到 HPV 18 感染。因此女性肺癌患者血球中 HPV 16 的感染，可能是經由子宮頸而感染至血球。由本研究之結果推測，台灣女性肺癌患者肺腫瘤組織中的 HPV 16 感染，有可能是由子宮頸而感染至血球，然後經由血液循環，而感染至肺組織。綜合以上研究結果，本研究發現血球中 HPV 感染不僅可做為台灣罹患肺癌之危險指標，同時又發現肺組

織中 HPV 的感染可能經由血液循環而感染肺臟，尤其是 HPV 16。

貳、文獻綜論

一、肺癌之流行病學與致癌機轉

1. 肺癌之流行病學

根據世界衛生組織分類，原發性肺癌可分為二大類：小細胞癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小細胞癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 兩類，其中非小細胞癌再分為鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinomas)、腺癌 (adenocarcinomas) 及大細胞癌 (large cell carcinomas) 等三種 (Scheffner et al., 1998)。在臨床上，約有 95% 的小細胞癌發生於大支氣管，在全部肺癌中佔了 20%。當罹患小細胞肺癌時，因在癌症初期即具有廣泛的擴散活性，容易擴散到其他器官，不易以外科手術方式治療，多以化學藥物合併放射線治療為主。另外約有 80% 肺癌病患屬於非小細胞癌，此類肺癌則大多以外科手術治療。但以現有的診斷方式，要在早期發現此類肺癌仍相當困難。且可接受手術治療的病例不到 20%，即使可以接受開刀的非小細胞肺癌之病例，其術後復發率還是相當的高。

據衛生署 90 年死亡統計資料指出，惡性腫瘤為國人十大主要死

因之冠，其中又以肺癌為首，尤其是由民國七十一年開始肺癌一直是女性的首要死因。而在男性方面，肺癌為第二大死因 (Fig. 1) (Department of Health, 2001)。在台灣，1955 年統計顯示男性與女性中，每十萬人口因罹患肺癌死亡分別為 2.67 人和 1.25 人，但自 2001 年後，男、女性肺癌的死亡率分別為每十萬人口中有 40.28 人與 17.91 人，在這四十五年之間，暴增了十四倍到十五倍 (Department of Health, 2001)，是惡性腫瘤所造成之死亡數中增加速度最為顯著的一種癌症。1980 年台灣流行病學調查發現男性的肺癌死亡率已逐漸趨緩，但女性的肺癌死亡率卻仍大幅上升，依據衛生統計報導，每年約有 1200-1300 位台灣婦女死於肺癌。近年來，女性肺癌死亡率增加的幅度顯著高於男性。1987 年起美國女性肺癌的死亡率已超越乳癌成為美國女性癌症死因首位 (Ernster et al., 1994)。在台灣地區，自 1982 年以來，肺癌一直是台灣女性癌症的第一大死亡原因。在上海、香港、新加坡等地，女性肺癌死亡率也是高居第一位。雖然抽菸被認為是引起肺癌的主要原因，但華人婦女有低比率人口抽菸，卻相對高比例人口罹患肺癌。可能有其他的潛存致病因素值得探討。因此研究台灣地區肺癌發生，尤其是女性肺癌之致病因子和肺癌形成機轉是當前非常重要之課題。

2. 與肺癌形成有關之環境因子

一般認為抽菸是引起肺癌的最主要因子，在西方國家男女性肺癌患者抽菸比率分別約百分之九十及百分之七十 (Koo et al., 1990)，因此對於高抽菸率的國家，抽菸可以用來解釋肺癌形成。但台灣肺癌病患抽菸男、女性比率分別為百分之六十與百分之四，即台灣女性肺癌患者多不抽菸。因此多數台灣女性肺癌患者無法以抽菸來解釋。在不抽菸之族群中女性肺癌發生率比男性高，且好發腺癌的趨勢並不隨著不同民族而有不同。年紀較輕而得到肺癌的人的病因，在不同地區可能有所差異。在歐美，通常是抽菸量大的人會提早發病。而在亞洲國家，早年發病之患者反而很少抽菸。可能有另外的危險因子，促使這些患者提早發病。流行病學研究指出，中國女性肺癌發生與其烹調的方式、烹調的餐數、烹調時的油煙大小及烹調用油都有關 (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)。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，可以液態層析質譜儀分析到 BPDE-N2-dG 鍵結物的存在 (Yang et al., 2000)。此外，已有許多研究發現，二手菸與肺癌形成有關。Adlkofer et al., (2001) 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。在香港及中國大陸上海地區的研究報告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 (Koo et al., 1985; Gao et al., 1987)。但 Chen et al. (1990) 調查分析卻發現台北地區民眾肺癌發生與暴露二手菸有關。因此，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，仍需進一步研究。除了抽菸、油煙及二手菸之外，與肺癌形成有關的因子還包括職業暴露 (金礦工人、煉銅礦工人、製造殺蟲劑及洗羊的消毒水工人)、放射線物質 (鈾礦、氬氣)、空氣污染、營養因素 (維生素 A) 及肺部疾病 (肺結核) (陳建仁, 1997)。因此，以現有診斷方式，要早期發現肺癌仍相當困難，但是肺癌的早期發現對於肺癌預後情況具有關鍵性的影響，因此以分子醫學技術，建立早期肺癌的診斷指標，是重要之研究課題。

在肺癌致癌機轉方面，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)，會與 DNA 共價結合形成 DNA 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)。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 (Dipple et al., 1987)。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。DNA 鍵結物常會造成鹼基在配對時發生錯誤而導致基因突變，而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。由本研究室先前研究發現，肺癌患者之 DNA 鍵結物含量顯著高於非癌症患者，且不抽菸女性肺癌患者確實有較高之 DNA 鍵結物含量 (Cheng et al., 2000)。

3. 肺癌形成之分子機轉

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。P53 抑癌基因位於染色體 17p13.1 的位置，全長為 20-kb，含有 11 個 exon，可轉譯出 393 個氨基酸，及 53-kDa 的核蛋白。P53 蛋白的功能，可促進一些基因的表現，例如 GADD45 (Kastan et al., 1992; Lu et al., 1993)、p21^{WAF1} (El-Deiry et al., 1993)、cyclin G (Okamoto et al., 1994)、Bax (Miyashita et al., 1995) 和 mdm2 (Barak et al., 1993)，而這些基因皆參與細胞週期

(cell cycle)及細胞凋亡 (apoptosis)。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；但若 DNA 傷害過大而無法修復時，p53 便會促使細胞走向凋亡 (apoptosis)。在先前已討論抽菸與 p53 蛋白去活化之關係，另一方面，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，

p16-Rb 路徑也是與癌症形成有關的調控路徑。p16 基因是位於染色體 9p21 的位置 (Serrano et al., 1996)，會因為 p16 基因啟動子 (promotor)的甲基化而不活化 (reviews in Zöchbauer-Müller et al., 2001)。p16 蛋白包含了 156 個胺基酸序列，其主要功能是和 cyclin-dependent kinase 4 及 6 (CDK 4, CDK6) 結合抑制其功能 (Hirai et al., 1996)。CDK4 及 CDK6 必須與 cyclin D 結合，才具有將 Rb 蛋白磷酸化之活性。而此路徑另一個主角為 Rb 蛋白，位於染色體 13q14.11 的位置，可轉譯出一個 105-kDa 的蛋白 (Ewen et

al., 1994)。當 Rb 蛋白被磷酸化後將無法與 E2F 基因結合，因而 E2F 會被釋放出來，而使細胞繼續生長。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)。在大部分的肺癌研究中，發現肺癌組織上的 p16 蛋白或 Rb 蛋白其中之一是不活化的，卻未曾發現 p16 蛋白及 Rb 蛋白同時不活化的情形 (reviewed in Zöchbauer-Müller et al., 2002)。有些病毒蛋白會直接影響 Rb 蛋白的活性。包括 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。

二、人類乳突瘤病毒與其感染路徑

1. 人類乳突瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV)

人類乳突瘤病毒為一雙股 DNA 病毒，其環狀病毒基因體全長為 7600-8000 bps，會感染層狀上皮細胞。可從皮膚表層及黏膜表層分離出。不同型的人類乳突瘤病毒，其分型主要是依據 E6, E7 及 L1 的基因序列有大於 10% 的不同，即定義為不同型，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.)。目前已發現的人類乳突瘤病毒約有一百種以上 (Chan et al., 1995 ; Hart et al., 2001)。其中以致癌能力可區分高危險型及低危險型。高危險型 HPV 16/18 易使病灶發展成惡性腫瘤，相反的，低危險型 HPV 6/11 會誘發良性的生殖道疣和惡性腫瘤發生較無關。其基因體可分為三個區域 (Fig. 2) : long control region (LCR)、early region 及 late region。而 early region 是轉譯出調節性蛋白 (E1、E2、E4、E5、E6、E7)，late region 主要是轉譯出結構性蛋白 (L1、L2)。分別簡介如下：

1.1 早期基因 (early gene)

(1) E1 調節蛋白，功能主要是與病毒本身的複製有關。E1 可活化 helicase 及 ATPase 並鍵結到 LCR (long control region) 中的複製起點，促使病毒開始複製蛋白 (Piccini et al., 1995)。E1 亦可和細胞 DNA 的聚合酶 α 結合，來起始病毒的複製 (Bonne-Andreac et al., 1995)。

(2) E2 調節蛋白，會影響病毒的轉錄及複製。在人類子宮頸角質細胞中，人類乳突瘤病毒第十六型及第十八型其 E2 蛋白的功能是一個轉錄活化子 (Bouvard et al., 1994 ; Cripe et al., 1987 ; Phelps et

al., 1987)。E2 蛋白經由與 E6/E7 promotor 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)。在子宮頸癌組織及由子宮頸癌分離出的細胞株其 HPV 通常有 E2 基因序列的刪除，使 E2 無法抑制 E6/E7 基因表現，而造成 E6/E7 大量表現，進而使人類細胞轉型 (Schwarz et al., 1985)。此外 E1、E2 的刪除與病毒 DNA 嵌入 (integration) 宿主基因群有關，此嵌入作用較常發生於高危險型的人類乳突瘤病毒。目前利用 PCR、southern blot 及 restriction-site PCR (RS PCR) 研究 HPV 病毒的嵌入情形，發現 HPV 病毒會從 E1 或 E2 的位置斷裂，而嵌入人類的染色體，使 E2 基因無法表現進而無法抑制 E6 及 E7 基因表現，使得宿主細胞不斷的複製增生 (Cullen et al., 1991；Thorland et al., 2000)。

(3) E4 調節蛋白，位於病毒基因體的 early region，但在病毒複製晚期才會表現，會累積於感染人類乳突瘤病毒的高度分化細胞 (Palevsky et al., 1991)。近來研究發現，E4 蛋白會破壞正常細胞的角素，影響正常細胞的分化 (Doorbar J et al., 1991)。

(4) E5 調節蛋白，是一個斥水性蛋白。在 bovine papillomavirus 研究中發現，E5 蛋白會和許多穿膜蛋白結合，形成複合物；像是表

皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor)、血小板生長因子 β 受體 (platelet-derived growth factor β receptor)、刺激群落生長因子-1 受體 (colony-stimulating factor-1 receptor)。而 HPV 16 E5 蛋白亦可和 ATPase 結合。此外，E5 具有微弱的細胞轉型能力，會誘導 protein kinase C 及 membrane-bound protein kinase 的活化。除此之外，E5 蛋白的功能還不是很清楚 (Zur Hausen et al., 2000)。

(5) E6 調節蛋白，全長有 150 個胺基酸序列，含有兩個 zinc-finger motif，會和 E6AP 結合而降解 p53，進而起始抗凋亡反應 (Werness et al., 1990)，亦會降解其他的 proapoptotic 蛋白，例如 Bak 及 Bcl-2 家族 (Thomas et al., 1998; Thomas et al., 1999)。E6 亦可活化終端酶 (telomerase)，這也許和染色體 3 p 及 10 p 基因座的刪除有關 (Klingelutz et al., 1996)。此外，E6 蛋白會藉由 ubiquitin proteasome pathway 進行 p53 蛋白水解 (Fig. 3)，此系統作用過程主要可以分為兩步驟 (Ciechanover et al., 1994; Jentsch et al., 1995; Hochstrasser et al., 1996; Smith et al., 1996)。首先，ubiquitin 在有 ATP 存在下，經由活化 C 端 glycine 和 p53 蛋白的 lysine 胺基酸形成共價鍵結。之後 ubiquitin 可作為受質，再接上 ubiquitin，形成 polyubiquitin chain，此過程稱之 ubiquitination。在第二步中，接有

polyubiquitin chain 的 p53 蛋白，可被蛋白水解酵素 (26S proteasome) 辨識而被水解，在水解完成後中利用 deubiquitin enzyme 將 polyubiquitin chain 分解為 mono-ubiquitin 供細胞回收重複利用。

高危險型 HPV E6 蛋白主要是利用 ubiquitin proteasome pathway 將 p53 蛋白水解。在無 HPV DNA 存在的細胞中，mdm2 會透過 ubiquitin proteasome pathway 來降解 p53 (Honda et al., 1997)。然而，有病毒感染時，mdm2 透過 ubiquitin proteasome pathway 降解 p53 的路徑會被抑制。最近的研究也指出，在 HPV-positive 的癌細胞中，若 p53 完全被 E6 降解，其 mdm2 pathway 是完全不活化的 (Hengstermann et al., 2001)。此結果顯示當細胞正常功能被抑制時，E6 可以降解 p53。E6 不僅利用 p53 不穩定來抑制其活化，亦可利用其他路徑來抑制 p53；E6 會干擾 p53 和其他 DNA 的結合，也會和轉錄活化子 p300/CBP 作用來抑制 p53、NF- κ B 的啟動子 (promotor)。又有研究發現在 HPV E6 蛋白 C 端含有 PDZ-binding motif (XT/SXV)，全長為 80 -90 胺基酸序列，可和極細胞 (polar cell) 表面的特殊構造結合形成離子通道、訊息傳遞酶及附著分子 (reviews in Kim et al., 1997)。

(6) E7 調節蛋白為含有 98 個胺基酸之病毒核蛋白，可被 casein

kinase II (CKII) 磷酸化。目前已發現 E7 可和 Rb、p107、p130、histone deacetylase (HDAC)、AP-1 轉錄因子、cyclins、cyclin-dependent kinases (cdks) 及 cdk 抑制劑結合。最重要的功能是可以和 pRb 及 Rb-related pocket protein (p107 及 p130) 結合 (Dyson et al., 1989; Dyson et al., 1992)，藉由將 pRb 磷酸化使轉錄活化子 E2F 釋出，活化細胞增殖基因的轉錄作用 (Fig. 3) (Bagchi et al., 1990; Bandara et al., 1991)，但 E7-Rb 的結合在 E7 造成不死化的作用中是非必須的 (Jewers et al., 1992)。在最近的研究中發現，E7 不須經由 pRb 的結合，可直接和 E2F 結合而造成細胞轉型 (Hwang et al., 2002)。在正常細胞中，E2F 的轉錄活性是受 cyclin/cdk 磷酸化 pRb 來調節。因此，在細胞週期中，cyclin E、cyclin A 及 cdc25A 的活化，使 E2F 起始轉錄活性是造成細胞轉型的原因之一。

E7 蛋白另一個功能是抑制 cyclin dependent kinase 的抑制子 (inhibitor)，包括 p21^{CIP-1} 及 p27^{KIP-1}。p21^{CIP-1} 及 p27^{KIP-1} 蛋白的正常功能是抑制 cyclin 及 cdk 的活性。因此，若 E7 蛋白抑制 p21^{CIP-1} 及 p27^{KIP-1}，則 Cyclin 及 cdk 會持續磷酸化 Rb，使 E2F 起始轉錄活性 (Funk et al., 1997; Jones et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996;)。E7 亦可與干擾素調節蛋白 p48 結合，抑制干擾素

訊息傳遞的路徑 (Barnard et al., 1999)。由先前研究發現，在有 E7 表現的正常細胞中，Mdm2 無法和 p53 結合，使 p53 表現量增加及半衰期變短，推測可能原因是 E2F 活化 p14^{ARF} 去抑制 Mdm2 降解 p53 (Bates et al., 1998)。有趣地，在 Seavey et al., (1999) 的研究中發現，E7 不會使 p14^{ARF} 增加，且在缺乏 ARF 的老鼠胚胎纖維母細胞中，E7 可使 p53 穩定。結果顯示 E7 可能有不同的機制去穩定 p53 (reviews in Münger et al., 2001)。

1.2 晚期基因 (late gene)

L1 及 L2 基因序列在人類乳突瘤病毒各基因型之中有高度的相似性 (Bernard et al., 1994a)，是一結構性蛋白，在病毒合成時，L1 及 L2 蛋白會進到細胞核內進行病毒組合 (assembly) (Zhou et al., 1991)。所以，L1 及 L2 只在高度分化的角質細胞中才會表現，而被稱為晚期基因。

1.3 Long control region (LCR)

LCR 全長約有 800-900 bps，又稱為上游調節區，並未包含任何基因，但內藏 DNA 的複製起點，並且是重要的轉錄調節區 (Mendelsohn et al., 1995)。

2.人類乳突瘤病毒感染路徑

人類乳突瘤病毒可能經由性行為及非性行為路徑來傳染。在性行為傳染方面，已有研究發現年齡較輕就發生性行為者、發生性行為的次數、性伴侶人數多及性伴侶有生殖道疣者，有較高危險感染人類乳突瘤病毒 (Franco et al., 1995 ; Kenney et al., ; Lenner et al., ; Wheeler et al., 1993)。在非性行為傳染方面，皮膚的軟疣形成可能是由皮膚接觸而傳染，其次為若皮膚受傷，人類乳突瘤病毒易由傷口進入而感染 (Shan et al., 1990)。若產婦其生殖道有人類乳突瘤病毒感染，會經由垂直傳染給嬰兒，其嬰兒出生後，可能會產生呼吸道乳突瘤 (Rice et al., 1999)。又有研究發現，若使用口服避孕藥會增加人類乳突瘤病毒感染的危險 (Franceschi et al., 1983)。人類乳突瘤病毒亦可能經由診療器而感染；在診療生殖道有人類乳突瘤病毒感染的病患的器具中，其人類乳突瘤病毒 DNA 的檢測率為：手術手套 (50%)、biopsy forceps (37%) 及 cryoprobe tips (23%)；用 Savlon 酞劑消毒 biopsy forceps 及用 90% 酒精處理 cryoprobe tips 後，人類乳突瘤病毒 DNA 的檢測率仍可測到 1.6% 及 4.5% (Ferenczy et al., 2000)。又有研究發現頭頸部癌症、膀胱癌、食道癌、支氣管癌、直腸癌及肺癌之腫瘤組織中有 HPV DNA 存在，這些器官中的 HPV 是從什麼傳染路徑而來，是值得

研究之課題。

三、人類乳突瘤病毒在人類腫瘤之研究

1.人類乳突瘤病毒與人類腫瘤形成之相關性

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。因為有極高比例的子宮頸癌患者有 HPV 的感染，尤其是高危險型之 HPV 16 及 18 (Zur Hausen, 1991)。而在台灣地區子宮頸癌患者，HPV DNA 分佈與大多數地區一樣，主要是以 HPV 16 為主 (Liaw et al., 1995 ; Chen et al., 1993)，但有研究發現台灣子宮頸癌患者 HPV 52 及 HPV 58 感染率和 HPV 16 一樣高 (Huang et al., 1997)。此外，在其他癌症也發現有 HPV 感染，例如膀胱癌 (感染率為 0% ~ 52.8%)、食道癌 (5.8% ~ 60%)、支氣管癌 (0% ~ 11.8%)、頭頸癌 (9% ~ 91%)、口腔癌 (48.9% ~ 50%)、喉癌 (25% ~ 35.7%)、直腸癌 (0% ~ 84%) (Table 1)，甚至肺癌亦都發現有 HPV 的感染，但這些癌症的形成與 HPV 之間的相關性仍有待釐清。在子宮頸抹片中細胞表現正常之婦女有 6-46% 不等的 HPV 感染率 (Ekalaksananan et al., 2001 ; Zielinski et al., 2001 ; Torroella-Kouri et al., 1998 ; Bauer et al., 1991)，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 (Bauer et al., 1993)。在台灣流行病學的研究中也發現 (Table 2)，子宮頸抹片中細胞表現正常的婦女其 HPV 的感染率從 0% - 21% (Taso et al., 1994 ; Liaw et al., 1995 ; Pao et al., 1997 ; Sun et al., 2002) 不等，且主要以 HPV 16 為主，而在子宮頸癌組織的 HPV 感染率由 31.9% - 86.7% (Chen et al., 1993 ; Tseng et al., 1996 ; Hsu et al., 1997 ; Lee et al., 1997 ; Shyu et al., 2001)。雖然子宮頸與 HPV 感染之相關性如此密切，但仍有 10% 的子宮頸癌患者並沒有 HPV 的感染。

2. 人類乳突瘤病毒與肺癌形成之相關性

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)。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 (感染率為 5.9%) (Bohlmeier et al., 1998)，日本 (0% - 80%) (Szabo et al., 1995; Hirayasu et al., 1996 ; Nakazato et al., 1997 ; Tshako et al., 1998 ; Iwamasa et al., 2000 ; Miyagi et al., 2001)、芬蘭 (9.2%) (Syrjanen et al., 1989 ; Nouva et al., 1995; Soini et al., 1996)、德國 (0%)

(Shamanin et al., 1994; Weit et al., 1996)、法國 (2.7%-16%) (Thomas et al., 1995; Clavel et al., 2000)、波蘭 (10%) (Miasko et al., 2001)、希臘 (39.4%) (Papadopoulo et al., 1998)及中國大陸 (12%-50%) (Xing et al., 1993; Liu et al., 1994; 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 3 中。在美國、德國、土耳其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，甚至偵測不到 (Bohlmeyer et al., 1998; Weit et al., 1996; Thomas et al., 1995; Kaya et al., 2001)。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 9%，而肺鱗狀上皮細胞癌 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，似乎與人種和地域的差別有關。本實驗室亦發現在肺腫瘤組織上有 HPV 16/18 DNA 存在，推論 HPV 16/18 感染和台灣女性肺癌形成有關 (Cheng et al.,

2001)。因此，本研究擬探討血液循環中 HPV 的感染率及 HPV 可能的感染路徑，以了解 HPV 感染在肺癌形成所扮演的角色。

參、研究動機

肺癌是台灣癌症死因的第一位，且有逐年增加的趨勢。由流行病學上的研究指出，在西方國家中，如歐洲及美國，抽菸為導致肺癌的主要原因。然而，在台灣大部分的女性肺癌患者都是不抽菸者，因此可能有其他因子參與不抽菸者肺癌的形成。由本研究室先前研究發現，肺癌病患的組織上的 HPV 感染率較高(比非肺癌組織)，且其 p53 蛋白不表現，但突變率比其他研究低，和子宮頸癌的致癌機轉相似。因此，推測 HPV 16/18 感染可能和台灣不抽菸女性肺癌形成有關 (Cheng et al., 2001)。因為子宮頸是 HPV 16/18 主要感染的器官，而血流是肺組織及子宮頸唯一主要連結通道，在子宮頸癌的研究亦發現週邊血液淋巴球可測得 HPV DNA (Pao et al., 1991)；在本實驗室先前研究中也發現，在肺癌病患肺腫瘤組織切片上的淋巴球及血球抹片上可測得 HPV DNA，因此，推論肺組織中的 HPV 感染可能源於子宮頸，經由血液循環感染至肺組織。另一方面，在肺癌患者血球之 HPV DNA 偵測可能可用來當作肺癌診斷的新標記。因此，在肺癌患者的血液循環中偵測 HPV 在臨床上是重要的。

本研究擬探討在肺癌病人的血球中 HPV DNA 的偵測，是否可用來當作危險評估工具的可能性，及肺組織中 HPV 之可能感染

路徑。經由偵測肺癌病患及非癌症控制組之週邊血球 HPV 的感染率，來評估在肺癌致癌機轉上 HPV 感染的臨床意義。又藉由偵測同一病人之血球及腫瘤組織檢體與血球及子宮頸抹片檢體中 HPV 感染的情形，以了解其感染路徑。

肆、材料與方法

一、檢體收集

本研究是採取病例對照研究(case-control study)。所選取 149 位肺癌患者血液檢體來源分別為：75 位血液檢體及其中 15 位女性肺癌患者之子宮頸抹片檢體由中山醫學大學附設醫院提供；74 位血液檢體及其中 70 位肺癌患者之肺組織檢體由台中榮民總醫院所提供。患者資料列於 Table 5。而 175 位非癌症控制組由一大型體檢(彰化縣芳苑鄉衛生所)所得，基本資料列於 Table 6。

二、材料與藥品

1. DNA 萃取

GenoMaker Kit 購自台灣真興公司，NaOAc (sodium citrate) 購自德國 Merck 公司，Phenol, chloroform, ethanol 則購自台灣皓峰公司。

2. 血液及子宮頸抹片檢體中 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. 血球 RNA 萃取及 HPV E6 mRNA 之測定

Rare RNA Kit 購自台灣真興公司，RNasin 購自美國 Gibco BRL 公

司，DNase, MgCl₂, isopropanol, DEPC (diethyl pyrocarbonate), DTT (DL-Dithiothreitol) 購自美國 Sigma 公司。SDS, EDTA, NaOH, NaOAc 購自美國 Sigma 公司。DyNAzyme™ II DNA polymerase 購自美國 Bio-Labs 公司。另外，dNTP 及 primer 購自美國 Gibco BRL 公司。

三、實驗方法

1. 肺癌患者血球之 DNA 萃取

在 2 ml 的全血中加入 6ml 的 1X 紅血球 lysis buffer (whole blood : 1X lysis buffer = 1:3)，混合均勻後，置於冰上 30 分鐘後，將紅血球水解，以 3,000rpm 離心 15 分鐘，離心後倒掉上清液。以 1X PBS 重複洗三次。剩下的白色沉澱物即為白血球，利用此方法將白血球分離出來。取 1 ml 的 GenoMaker 將白色沉澱物沖散，置於室溫 30 分鐘，使白血球水解。之後分成 2 管，各 500 ul，以傳統的 phenol/chloroform 法除去蛋白質。先加入 500 ul 的 phenol/chloroform (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 50 μ l 3M NaOAc (pH 5.2)及 1 ml 的 100%冰酒精於-20°C 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 的 75%酒精

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 -20°C 冰箱保存，以用於 HPV DNA 的檢測。

2. 肺癌患者腫瘤組織樣本之 DNA 萃取

將 50-100 mg 的肺腫瘤組織加入少量液態氮並加以研磨後，加入 500 μl 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 μl proteinase K (10mg/ml) 於 56°C 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 μl 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 μl chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 洗去殘餘之 phenol，充分混合後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液

加入 50 μ l 3M NaOAc (pH 5.2)及 1 ml 的 100%冰酒精於-80°C 冰箱作用 30 分鐘,藉以將 DNA 沉澱出。其後步驟同於血液 DNA 萃取。細胞 DNA 萃取直接加入 lysis buffer 及 5 μ l proteinase K (10mg/ml),於 56°C 作用 12-18 小時,其後步驟同於組織 DNA 萃取。

3. 女性肺癌患者子宮頸抹片之 DNA 萃取

請婦產科醫師採集抹片檢體後,將 cervix swabs 泡於無菌 1X PBS 溶液中,使子宮頸細胞落至 1X PBS 溶液中,將含有子宮頸細胞的 PBS 溶液離心 3000rpm,15 分鐘後,倒掉上清液後,取其細胞沉澱物萃取 DNA,其後步驟同於血液檢體 DNA 萃取。

4. 血球及肺腫瘤組織 HPV DNA 之測定

HPV DNA 的測定先以 MY09 及 MY11 為引子(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 反應來辨別感染 HPV 的種類,primer 的序列如下(McNicol et al, 1999) :

Consensus primer

MY09

GCMCAGGGWCATAAYAATGG

MY11

CGTCCMARRGGAWACTGATC (448-454 bp)

Type-specific primer

16.UP	TACTAACTTTAAGGAGTACC	
16.DN	GTGTATGTTTTTGACAAGCAATT	(223 bp)
18.UP	CCAAATTTAAGCAGTATAGC	
18.DN	TTGTACAAAACGATATGTATCCA	(193 bp)
β-actin primer		
UP	CAGGGCGTGATGGTGGGCA	
DN	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	(253 bp)

第一次 PCR 反應為 DNA 1 μg/μl、0.5mM dNTP、5μl 10×reaction buffer，2.5 U Taq polymorase 及 0.5 mM primer，最後以滅菌水將體積補到 50 μl。PCR 反應步驟依序為 denaturing: 94°C 1 分鐘，annealing: 55°C 2 分鐘，及 elongation : 72°C 1 分鐘，此循環重複 35 次，最後以 72°C 反應 10 分鐘。取出 5 μl 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 反應條件為 denaturing: 94°C 40 秒，annealing: 54°C 40 秒，及 elongation : 72°C 1 分鐘，此循環重複 35 次，最後以 72°C 反應 10 分鐘。反應後取 10μl PCR 終產物以 2% agarose 電泳膠進行分析，並以 SiHa 細胞株當做 HPV 16 的陽性對照組；以 HeLa 細胞當做 HPV 18 的陽性對照組，以蒸餾水當作陰性對照組。並於每個檢體進行 β-actin PCR 反應來當做內部對照。

5. 肺癌患者血球之 RNA 萃取及純化

將 2 ml 的全血加入 6ml 的 1X 紅血球 lysis buffer (whole blood : 1X

lysis buffer=1:3)，混合均勻後，置於冰上 30 分鐘後，將紅血球水解，以 3,000rpm 離心 15 分鐘，離心後倒掉上清液。剩下的白色沉澱物即為白血球，取 1 ml 的 Rare RNA buffer 將白色沉澱物沖散，置於室溫 30 分鐘，待白血球水解後加入 300 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 (DEPC-H₂O) 中。細胞之 RNA 萃取方法同上。RNA 純化的方法為將溶於 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°C 反應 30 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： $RNA ((g/ml) = A_{260} \times 40 \times \text{稀釋倍數}$ 。

6. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

取 5 μg RNA 以 10 pmole/ μl random primer，於 70°C 反應 10 分鐘，使 random primer 接合到 RNA 模板上，再加入 4 μl 反轉錄酵素反應 buffer、1 μl 0.1M DTT 及 1 μl 10mM dNTP 在 42°C 作用 2 分鐘後，再加入 1 μl 反轉錄酵素 (reverse transcriptase)，在 42°C 作用 1 小時，合成 cDNA 用作 PCR 分析用。HPV E6 mRNA 之測定採用的方法是 nested-PCR，primer 的序列如下(Pao et al., 1997)：

HPV 16

External primer

sense : GAACTGCAATGTTTCAGGACC
antisense : CGTGTTCTTGATGATCTGC 445 bp

Internal primer

sense : CAATGTTTCAGGACCCACAGG
antisense : GCAACAAGACATACATCGACCG 422 bp

HPV 18

External primer

sense : GCTACCTGATCTGTGCAC
antisense : TGCGTCGTTGGAGTCGTT 422 bp

Internal primer

sense : CAGTATACCCCATGCTGCATG
antisense : CGGTTTCTGGCACCCGACGGCACC 160 bp

先用 external primer 作第一次 PCR，PCR 反應如下：cDNA 2 μ l、0.5mM dNTP、5 μ l 10 x 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 $^{\circ}$ C 30 秒，annealing: 60 $^{\circ}$ C 30 秒，及 elongation : 72 $^{\circ}$ C 30 秒，此循環重複 20 次，最後以 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘。第二次 PCR 則取第一次的 PCR 產物 1 μ l 以同樣的方法用 internal primer 取代，此循環重複上述步驟 30 次。並以 GAPDH 當作一內部對照(internal control)。

7. 定序分析

將 PCR 產物以 GENECLAN III Kit (BIO 101, USA) 純化出來。首先加入 3x PCR 產物體積的 NaI，放於 55 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。再加入 5 μ l 的 EZ-GLASSMILK Suspension，在室溫作用 15 分鐘。將 EZ-GLASSMILK 與 DNA 的複合物，離心 5 秒鐘，然後用 800 μ l 的 NEW WASH buffer 洗 2 次。將其乾燥後，溶於 12 μ l 的滅菌水，將 sample 離心 30 秒後，將上清液取到另一新的 microtube 中。先

確定純化後 DNA 的品質後，用 Applied Biosystems 310 自動定序儀來定序。

8. 統計分析

本研究之統計是以 SPSS 統計軟體進行 HPV 16/18 感染的統計分析。以卡方檢定(χ^2 -test)方法分析 HPV 16/18 感染與臨床因子的相關性及不同檢體其 HPV 感染的相關性。又以多變項邏輯式迴歸方式分析 HPV 16/18 感染與罹患肺癌之危險性評估。

伍、結果

一、以 nested-PCR 偵測 HPV 16/18 DNA 之可信度實驗

由於重疊式 PCR (nested-PCR) 方法需經過兩次 PCR 增幅基因產物，較易有偽陽性，為了確認 PCR 增幅時所用引子的專一性，以 SiHa 細胞 (HPV 16 positive) DNA 為模板，以 HPV 18 引子進行 PCR 增幅，並以 HeLa 細胞 (HPV 18 positive) DNA 為模板，以 HPV 16 引子進行 PCR 增幅，以了解 PCR 的 annealing 過程中，對 HPV 16 (18) 具有專一性的引子，不會接上含有 HPV 18 (HPV 16) 的序列，而獲得 PCR 產物。由 Fig. 4 結果得知 HPV 16 引子只在 SiHa 細胞及感染 HPV 16 的血球 DNA 增幅出一 223 bp 的片段，而 HPV 18 引子在 HeLa 細胞及感染 HPV 18 的血球 DNA 增幅出一 193 bp 的片段，並利用 β -actin (253 bp) 當作一內部對照 (internal control)。結果發現各引子對不同形式之 HPV 具有專一性。為了進一步避免實驗上的誤差，將 PCR 分析所得的產物以 DNA 自動定序儀定序，以確定所得之 PCR 產物是否是所要偵測之 HPV DNA 片段，結果如 Fig. 5 所示，HPV 16/18 PCR 產物的 DNA 序列是正確的。因此經由兩次之確認，本研究以重疊式 PCR 所得之 HPV 16/18 的結果是可信賴的。

二、肺癌患者與非癌症控制組血球中高危險型 HPV16/18 感染之比較

由先前研究發現，台灣肺癌患者肺腫瘤組織中有 HPV 感染 (Cheng et al., 2001)，且在肺癌患者血球抹片上亦發現 HPV 感染於血球 (Fig. 6)。因此本研究進一步想了解台灣肺癌患者與非癌症控制組血球中 HPV 的感染率。本研究分析 149 位肺癌患者及 175 位非癌症控制組之血球中 HPV DNA 的感染情形。肺癌患者與非癌症控制組之年齡及性別差異均無統計上的意義，但在抽菸習慣上卻有統計上的相關性，癌症患者與非癌症控制組之抽菸比例 50% (75 of 149) 及 39% (68 of 175) ($P=0.038$, Table 7)。本研究以巢疊式 PCR (nested-PCR) 分析血液是否有 HPV DNA 的存在，結果如 Fig. 4 所示。由 nested-PCR 及 ISPCR 分析結果顯示，在台灣肺癌患者血球中確實可測得 HPV DNA 存在。且發現肺癌患者血球中有高危險型 HPV 16 及 HPV 18 的感染，感染率分別為 52.9% (78 of 149) 及 30.9% (46 of 149)，都顯著高於非癌症之控制組之 HPV 16/18 的偵測頻率 ($P < 0.001$)，即非癌症控制組之 HPV 16/18 的偵測頻率分別為 12.6% (22 of 175) 和 5.1% (9 of 175) (Table 8)。由以上結果得知，肺癌患者血球中 HPV 16/18 感染均高於非癌症控制組。

三、血球中高危險型 HPV 感染與臨床因子的相關性

當進一步分析 HPV 16 及 HPV 18 DNA 之偵測與肺癌患者之年齡、性別、抽菸習慣、腫瘤形式及腫瘤分期之相關性時發現，HPV 16 的感染頻率與患者之性別、腫瘤形式和腫瘤期別都有統計上的相關性，而 HPV 18 的感染僅與年齡有關 (Table 9)。這結果顯示女性、肺腺癌和晚期之肺癌患者之 HPV 16 之感染頻率較男性、鱗狀上皮細胞癌和早期之肺癌患者為高。但僅有年齡高於 67 歲的患者有 HPV 18 的感染率較年齡較低者高 ($P = 0.001$)。而 HPV 16 感染與年齡不具有統計上的意義 (HPV 16： <67 歲 45.2%， ≥ 67 歲 50.6%； $P = 0.588$)。由以上的實驗結果得知，女性肺癌患者似乎比男性肺癌患者容易感染 HPV，且 HPV 16 的感染率比 HPV 18 高。在腫瘤期別與腫瘤形式的分析也發現，晚期肺癌患者與肺腺癌患者之 HPV 16 感染率比早期肺癌患者與肺鱗狀上皮細胞癌患者高。

非癌症控制組 HPV 感染與年齡、性別及抽菸習慣的統計分析結果，僅發現 HPV 16 感染與年齡具有相關性。即年齡低於 67 歲的非癌症控制組 HPV 16 感染率較年齡較高者高 (HPV 16： <67 歲 19.5%， ≥ 67 歲 6.5%； $P = 0.009$ ，Table 10)。

四、HPV 感染做為肺癌的危險生物指標之多變項統計分析

由上述的實驗結果得知，肺癌患者血液循環中 HPV 16/18 感染高於非癌症控制組。因此進一步利用多變項線性回歸統計分析血球中 HPV 16/18 感染、年齡、性別及抽菸習慣等因子是否可做為罹患肺癌之危險因子？經統計分析發現同時感染 HPV 16 及 HPV 18罹患肺癌的危險性，竟高達 38.52 倍，其 95% 的信賴區 5.15-288.17 ($P=0.0004$)，具有顯著統計意義 (Table 11)。另外，在 HPV 16 或 HPV 18 單獨感染方面，發現 HPV 16 感染比未感染 HPV16 的人有 6.51 倍的危險罹患肺癌，其 95% 的信賴區間為 3.73-11.38 ($P < 0.0001$)。而 HPV 18 感染有 9.24 倍的危險罹患肺癌，其 95% 的信賴區間為 4.25-20.04 ($P < 0.0001$)。Table 6 的結果顯示抽菸者比非抽煙者有 2.08 倍罹患肺癌的危險性，其 95% 的信賴區間為 1.05-4.11 ($P=0.0351$)。由以上結果得知，同時感染 HPV 16 及 HPV 18 比單獨感染 HPV 16 或 HPV 18 有較高的危險性。由多變項之分析結果顯示，血球中有 HPV 16/18 DNA 的感染可用來做為罹患肺癌的危險生物指標。

五、肺癌患者肺組織中 HPV 的傳染路徑

為了了解台灣肺癌患者肺組織中 HPV 的感染路徑，是否是經由血

液循環中的血球而來，本研究收集 149 位肺癌患者血液檢體中有 70 位肺癌患者，同時收集到外科手術取得之肺腫瘤組織，同樣利用 nested-PCR 偵測這 70 位肺癌患者血球及肺腫瘤組織的 HPV 16/18 感染情形。結果發現 70 位肺癌患者血球中 HPV 16 及 HPV 18 感染率分別為 50% (35 of 70) 及 35.7% (25 of 70)，70 位肺癌患者肺腫瘤組織中 HPV 16 及 HPV 18 感染率分別為 42.9% (30 of 70) 及 18.6% (13 of 70)。由以上結果顯示，血球中的 HPV 感染率比肺腫瘤組織高。進一步分析血球與肺腫瘤組織之 HPV 16/18 感染的相關性時發現，在 35 位血球中有 HPV 16 感染的肺癌患者有 62.9% (22 of 35) 在肺腫瘤組織中可測到 HPV 16 DNA，而 35 位血球中沒有 HPV 16 感染的肺癌患者有 77.1% (27 of 35) 在肺腫瘤組織中未感染 HPV 16。因此共有 70% (49 of 70) 的肺癌患者其血球及肺組織之 HPV 16 感染具有一致性，具有統計上的意義 ($P=0.001$, Table 12, Fig. 6)。我們發現 8 位男性，同時未發生轉移的肺癌患者，僅在肺腫瘤組織中發現 HPV 16 感染，但血球中卻未發現。因此推測男、女性肺癌患者的感染路徑可能有所不同。25 位血球中 HPV 18 感染的肺癌患者有 8% (2 of 25) 在肺腫瘤組織中可偵測到，而 45 位血球中沒有 HPV 18 感染的肺癌患者有 75.6% (34 of 45)，在肺腫瘤組織中未感染 HPV 18。統計結果發現，僅有 51.4% 的肺

癌患者之 HPV 18 感染在血球及肺腫瘤組織之 HPV 感染具有一致性，但未達到統計意義 ($P=0.096$, Table 6, Fig. 7)。由以上結果推測 HPV 16 較 HPV 18 有可能經由血球感染至肺臟。

為了了解血球中的 HPV 16/18 是否是經由子宮頸而感染，本研究至今僅收集到 59 位女性肺癌患者中的 15 位患者之子宮頸抹片，同樣以 nested-PCR 偵測子宮頸細胞感染 HPV 的情形，再和血球中 HPV 的感染率比較其相關性。結果發現 15 位有血液及子宮頸抹片檢體的女性肺癌患者，12 位血球 HPV 16 感染的女性肺癌患者有 91.7% (11 of 12) 之子宮頸抹片有 HPV 16 感染，僅有一位患者未感染 HPV 16。而 3 位血球中沒有 HPV 16 感染的女性肺癌患者有兩位 (66.7%) 之子宮頸抹片未感染 HPV 16。因此有 86.7% 的女性肺癌患者之血球及子宮頸抹片 HPV 感染具有一致性，具有統計上的意義 ($P=0.022$, Table 13, Fig. 8)。另外，本研究發現 15 個子宮頸抹片檢體中沒有任何一個檢體偵測到 HPV 18 感染。由以上結果發現，HPV 16 感染在血球及子宮頸抹片中具有一致性。因此女性肺癌患者血球中 HPV 16 感染，可能是經由子宮頸而感染至血球。由以上結果推測，女性肺癌患者肺腫瘤組織中的 HPV 16 感染，可能是經由子宮頸，而感染至血球，繼而經由血液循環再感染至肺臟組織。

六、肺癌患者血球中高危險型 HPV DNA 及 E6 mRNA 表現的相關性

為確定 nested-PCR 偵測 HPV 16/18 DNA 的正確性，我們進一步製備 62 位肺癌患者之血球 mRNA，以了解 HPV E6 mRNA 的表現與 HPV DNA 的偵測結果是否一致。利用 HPV 16/18 E6 引子分別增幅出 422 bp 及 160 bp 的片段，並利用 GAPDH 作內部對照 (Fig. 9)。結果發現在 54 位血球中有 HPV 16 DNA 感染的肺癌患者中有 72.2 % (39 of 54) E6 mRNA 有表現，而 8 位沒有 HPV16 DNA 感染的肺癌患者都沒有偵測到 E6 mRNA 的表現，而在 HPV 18 E6 mRNA 的分析上也有相似的結果 (Table 14)。這結果可以再次增加前述 HPV DNA 偵測之實驗的可信度。

陸、討論

一、血液循環中 HPV 的感染

本研究所選取的檢體為血液檢體，可分成血清、血漿及血球細胞來分析。目前利用血液檢體來偵測 HPV 感染的研究，大多是偵測血清中的 HPV 抗體，而 HPV DNA 在子宮頸癌 (20%) 及頭頸癌 (0%) 病人的血清中偵測到比例極低 (Liu et al., 2001; Capone et al., 2000)。Dong et al., (2002) 研究顯示無論子宮頸癌病患 (6.9%) 或健康成人 (1.7%) 的血漿中都可偵測到少量的 HPV E7 DNA。與血清中的抗體偵測率相較之下，在血清及血漿中的 HPV DNA 偵測比例卻相對較低，推測可能是只能偵測到因細胞發生壞疽 (necrosis) 或凋亡 (apoptosis) 而游離於細胞外的 HPV。而在先前研究發現，同時偵測子宮頸癌病人其子宮頸細胞、血球及血清中 HPV DNA，子宮頸細胞 (100%) 無疑地比血球 (52.0%) 及血清 (8%) 中的 HPV 檢出率來的高，但血球的 HPV 檢出率比血清高 (Pao et al., 1991)。有許多研究亦發現 HPV DNA 或 mRNA 在血球中可測到 0% - 92.3% (Table 4)。且在 Karas et al., (1997) 的研究發現，在性病濕疣 (Condyloma acuminata) 的病灶處 HPV 感染率 (58.3%) 比血液循環中 (91.7%) 低。而本研究同樣也發現血球中 HPV 感染率

比肺腫瘤組織高。因此早期偵測血球中是否有 HPV 感染，或許較易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。

本研究的 149 位肺癌患者之血球中 HPV 16/18 感染率，分別為 52.4% 及 30.9%；與本研究室先前之研究發現 141 個肺腫瘤組織中 HPV 16/18 感染率分別為 35.5%及 41.1%，有較高的偵測率 (Cheng et al., 2001)。在血球中 HPV 16 之感染率遠高於 HPV 18 的感染率，但在肺腫瘤組織卻發現 HPV 18 感染率比 HPV 16 來的高。因此推測 HPV 感染可能經由身體的各個器官，包括口腔、生殖道、垂直感染或皮膚傷口感染，而散播至血液循環，在經由血球感染至各內臟器官。在子宮頸癌的研究發現，HPV 16 的感染率遠高於 HPV 18 (Bosch et al., 1995)。口腔癌亦有相同情況。但血球中必須有較高之 HPV 的病毒量，或是 HPV 16 及 18 的組織趨向不同，才有機會感染至肺組織。這還需要進一步偵測 HPV DNA 的 copy number，以了解是否是血球中有較高之 HPV DNA 的 copy number 才可能感染至肺組織。因此血球中能偵測到較高之 HPV 的感染，並不表示有能力感染至肺組織。而在非癌症控制組之比較，發現血球中 HPV 16/18 的感染率 (HPV 16 : HPV 18 = 12.6% : 5.1%)低於肺組織中的感染率 (HPV 16 : HPV 18 = 15.0% :

11.7%)，且肺組織 HPV 18 感染率比血液中高 6%。因此推測 HPV 18 對肺組織可能有特異的組織趨向。另一方面，血球及肺腫瘤組織中 HPV 感染率有此差異，可能是因為兩群患者其臨床因子具有差異性，分析兩群患者之臨床因子發現 (Table 15)，在樣本數、年齡、性別、抽菸習慣及腫瘤形式的差異不大，僅在腫瘤期別上有差異，先前研究的族群並不含有第四期的患者，而本研究有將近一半的肺癌患者是第四期患者 (42.9%)，有可能因肺癌晚期免疫力下降，使血球中的 HPV 16 感染率增加。

二、比較不同偵測 HPV 的方法

目前常用來偵測 HPV 的方法包括南方墨點法 (southern blot)、原位雜交法 (*in situ* hybridization:ISH)、Dot blot、PCR (polymerase chain reaction)及酵素免疫結合吸附法 (ELISA)。在臨床上的檢查，大多是用 ELISA 的方式來偵測血清中的抗體，其主要偵測對象為針對 HPV 的 L1、L2、E6 及 E7 蛋白的抗體，用來顯示過去 HPV 的曾經感染或現行感染 (Galloway et al., 1992)。因為 HPV 的分型主要是依據 DNA 的相似性，但目前血清學的分析只能偵測少數幾型來作特異的分型，其他分型無法用血清學分析來區分，且無法斷定病人體內是否有 HPV 病毒繼續存在。Southern

blot 及 ISH 的實驗方法並不經由增幅的步驟，而是直接偵測檢體或細胞中的 HPV DNA。雖然此兩種實驗方法有較高的特異性，但其敏感度比 PCR 來得差，例如 Southern blot 的實驗方法需要大量的 DNA (>10 μ g)。由於 PCR 的實驗是經過增幅的步驟，所以僅需少量的 DNA，有很高的敏感度及特異性，其敏感度比其他未經由增幅的方法高二至三倍 (Schiffman et al., 1995)。且 PCR 的方法快速、簡單且較便宜。目前常用來偵測 HPV DNA 的引子包括位於 HPV 基因上的 late region (L1 consensus, L1 specific)、early region (E6, E7) 及 URR (Long control region) 等三種。在先前比較正常及不正常的子宮頸抹片中 HPV 的感染率的研究中，發現偵測 E6、E7 及 URR 基因的引子的檢測率低於偵測 L1 基因的引子，推測可能是在生殖道腫瘤中 HPV 早期基因易發生變異，或因 HPV 基因發生嵌入，而影響 E6、E7 基因檢測率的準確性 (Tierney et al., 1993)。因此本研究室選擇 L1 consensus 來做 PCR 的引子。在過去有關 HPV 的偵測方法包括 nested-PCR, ISH 及 southern blot 等，由於不同實驗方法之敏感度差異極大，因此所測得的感染率亦有所差異。即使以相同方法偵測 HPV DNA，因為檢體取得及準備方式不同，亦會使得研究結果不盡相同。本研究室之前的研究以 nested-PCR 及 ISH 兩種方法偵測肺腫瘤組之中 HPV 16 及 HPV

18 的感染率，發現兩種方法具有很好的一致性 (HPV 16 : 73.3% ; HPV 18 : 85.8%) (Cheng et al., 2001)。由於本研究採用的檢體為血球，血球內所含的 HPV 病毒 DNA 的 copy number 可能不及腫瘤組織內所含，因此本研究選擇以敏感度較高的 nested-PCR 來偵測血球中的 HPV DNA，以期可準確偵測每一檢體是否有 HPV 的感染。

三、血球中 HPV 16 感染與腫瘤形式及腫瘤期別之相關性

由 HPV 感染與臨床因子分析中發現，HPV 16 感染與腫瘤形式及腫瘤期別有顯著的差異。本研究發現在肺腺癌患者之血球中，可以測到 HPV 16/18 DNA 且其感染率分別為 55.6% 及 32.2%，與本研究室之前研究肺腫瘤組織中 HPV 感染 (Cheng et al., 2001) 做一比較，發現兩種檢體均以肺腺癌有較高之 HPV 感染率。雖有肺癌研究指出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) 的研究發現 HPV 在肺鱗狀上皮細胞癌感染率有逐年下降的趨勢，由 1993 年的 79% 下降至 1998 年的 24%。Kinoshita et al., (1995) 的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%)，

Thomas 等人的研究結果發現在肺腺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 (Tshako et al., 1998)。在子宮頸癌方面，Tenti et al., (1998) 的研究也發現子宮頸腺癌患者有 70% 感染 HPV 16/18，比子宮頸鱗狀上皮細胞癌感染率高。但在過去的子宮頸癌研究中發現，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)。在本研究室的研究皆發現肺腺癌患者 HPV 感染率比肺鱗狀上皮細胞癌患者高。也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 70% 是肺腺癌所致。然而，HPV 16/18 感染在肺腺癌形成過程扮演的角色，仍需進一步研究。

在腫瘤期別分析中發現，晚期的肺癌患者 HPV 感染率比早期肺癌患者高，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外科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，因此可能增加 HPV 的感染。

四、肺癌患者 HPV 感染之可能路徑

過去有關肺癌與 HPV 感染的研究發現，在美國、法國及德國的肺癌病患肺腫瘤組之中的 HPV 感染率相當低，甚至沒有感染(Maisko et al., 2001; Clavel et al., 2000; Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992; Thomas et al., 1995)。但在挪威、日本及本實驗室的研究發現，肺癌患者之肺腫瘤組織有較高之感染率，且在挪威及日本這兩個國家之女性肺癌患者有 80% 有子宮頸病變病史。而本實驗室先前研究的女性肺癌患者大部分不具有子宮頸病變的病史，但其肺腫瘤組織仍有高達 40% 的 HPV 感染率。雖然目前本研究僅收集到 15 位女性肺癌患者的子宮頸抹片檢體，經細胞室的細胞學檢查發現其子宮頸抹片檢查皆正常，但同時採集的子宮頸細胞卻可偵測到 80% 有 HPV 感染。因此子宮頸即使沒有發生病變亦可能有 HPV 的感染。由 Kjaer 等人 (2001) 的研究發現，97 位未發生性行為的女性其子宮頸 HPV 感染率為 1.5%，經兩年後，有 67 位女性發生過性行為，其子宮頸 HPV 感染率提高至 35.4%。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)。另外，有研究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，高危險型之 HPV 之感染與性行為有關，但低危險型則無

關。Thomas 等人 (2001) 發現從事性工作之女性，有較高之高危險型 HPV 感染率。Olatunbosun 等人 (2001) 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 的感染率僅有 8%。因此男性可能藉由性行為將 HPV 感染給女性。由於本研究之肺癌患者全部是已婚者，因此推測台灣女性肺癌患者之子宮頸感染高危險型 HPV 16/18 可能主要經由性行為感染，而散播至血液，繼而經血球藉血液循環感染肺臟組織。

近幾年研究發現，HPV 亦和其他許多人類癌症有關，例如子宮頸癌、頭頸癌、喉癌、食道癌、膀胱癌和結直腸癌等。在頭頸癌中，HPV 感染率由 9% - 91% 不等 (Table 1)。在正常人之口腔中 HPV 的感染率由 1-60% 不等 (Mckaig et al., 1998)。因此 HPV 易感染黏膜細胞，所以容易感染子宮頸及口腔，造成子宮頸癌及頭頸癌。但膀胱、結直腸、肺癌中的 HPV 又是如何感染呢？在本研究室另外研究已發現 HPV 會感染血球 (取自本實驗室鄭雅文博士的實驗結果)，因此推論內臟器官中的 HPV 可能是自於子宮頸、口腔或呼吸道之感染，再經由血液循環中的血球而感染。

五、血液循環中 HPV 感染與肺癌之相關性

在本研究的 HPV 18 單獨感染與肺癌危險性之分析中發現，抽菸者的肺癌罹患危險性是非抽菸者的 2.08 倍，比較抽菸者與非抽菸者感染高危險型 HPV 罹患肺癌的危險性時發現，不抽菸者感染 HPV 16 罹患肺癌的危險性是未感染 HPV 16 的 9.24 倍(95% CI = 4-19.67, $P < 0.0001$)，感染 HPV 18 罹患肺癌的危險性是未感染 HPV 18 的 6.18 倍 (95% CI = 2.40-15.89, $P = 0.0002$)。在抽菸者中，感染 HPV 16 罹患肺癌的危險性是未感染 HPV 16 的 4.06 倍 (95% CI = 1.79-9.20, $P = 0.0008$)，感染 HPV 18 罹患肺癌的危險性是未感染 HPV 18 的 20.18 倍 (95% CI = 4.38-92.92, $P = 0.0001$)。顯然抽菸會協力增強 HPV 18 感染引起肺癌之危險性。過去研究發現，在抽菸婦女的子宮頸分泌物中有高量的香煙成分(Schiffman et al., 1987)，其造成子宮頸細胞突變的活性與肺臟組織相似(Phillips and Nishe, 1993)，且在動物模式中發現，受 HPV 18 轉型的人類包皮角質細胞暴露於 N-methyl-N-nitrosourea 和 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate 之後，將細胞打入裸鼠中，可誘發腫瘤形成 (Garrett et al., 1993)。因此，推論香菸及 HPV 為共同致病因子。

先前研究腫瘤生物標記都專注於分析和癌症有關的基因改變 (genetic alternation)；像是致癌基因 (oncogene)、腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene)及微小衛星序列 (microsatellite DNA sequence) (Gocke et al., 2000；Kopreski et al.,2000)。目前已有研究發現和腫瘤有關的基因標記，例如 p53，但這些標記僅與腫瘤發生率相關，卻不一定會引起腫瘤形成。以上之分析皆利用週邊血液來當做研究對象其原因是基於檢體取得方便。目前已有研究發現血液循環中的病毒 DNA 可做為腫瘤的生物標記，例如與鼻咽癌發生有關的 EB 病毒，和子宮頸癌形成有關的 HPV。有研究利用定量 PCR (real-time quantitative PCR)可測得大於 90%的鼻咽癌病人其血漿中有 EB 病毒 (Epstein-Barr virus)，此研究結果在診斷及監測鼻咽癌上被證明是完全可靠的 (Lo et al., 1999 & 2000)。而在子宮頸癌患者的血清及血漿中卻僅發現少量 HPV DNA，但在血球的 HPV 感染率則有 32.0% - 92.3% (Table 4) (Liu et al., 2001；Capone et al., 2000；Dong et al., 2002)。但上述之研究是萃取血球 DNA來偵測，並沒有足夠的證據證實 HPV 存在於血球中。本研究室則更進一步利用原位技術-ISPCR來證明 HPV DNA 確實存在於血球 (取自本實驗室鄭雅文博士的實驗結果)，且本研究利用 nested-PCR 偵測 149 位肺癌患者及 175 位非癌症控制組血球中

HPV 的感染率，發現同時感染 HPV 16 及 HPV 18 罹患肺癌的危險性高達 38.52 倍。因此血球中 HPV 感染在肺癌之預防上可當做重要的指標。

六、結論

由本研究結果得知，肺癌患者比非癌症控制組血球中 HPV 感染率高，且同時感染 HPV 16/18 者罹患肺癌的危險性比未感染者高 38.52 倍，因此血球中 HPV 感染在肺癌之預防上可當做重要的指標。且由 nested-PCR 及 ISPCR 結果發現，HPV 感染於血球細胞。且在女性肺癌患者子宮頸抹片亦發現 HPV 16 感染，因此推論女性肺癌患者肺腫瘤組織 HPV 16 感染，是由於子宮頸感染 HPV 16，而散播至血液循環，再經由血球感染肺組織。

柒、参考文献

- Adlkofer F. (2001) Lung cancer due to passive smoking-a review. *Int Arch Occup Environ Health*, 74:231-241.
- Agliano AM, Gradilone A, Gazzaniga P, Napolitano M, Vercillo R, Albonici L, Naso G, Manzari V, Frati L, Vecchione A. (1994) High frequency of human papillomavirus detection in urinary bladder cancer. *Urol Int.*, 53:125-129.
- Al-Ghamdi AA, Sanders CM, Keefe M, Coggon D, Maitland NJ. (1995) Human papillomavirus DNA and TP53 mutations in lung cancers from butchers. *Br J Cancer*, 72:293-297.
- Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, Scambia G, Fadda G, Maurizi M. (2001) Human papillomavirus infection and growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7:3988-3993.
- Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR. (1990) Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, 62:659-669.
- Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T, La Thangue NB. (1991) Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with common transcription factor. *Nature*, 352:249-251.
- Barnard P, McMillan NA. (1999) The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology*, 259:305-13.
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL and Vousden KH. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, 395:124-5.

- Bauer HM, Ting Y, Greer CE. (1991) Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *J Nat. Cancer Int.*, 265:472-477.
- Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Cadell DM, Kurman RJ, Manos MM. (1993) Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis*, 20:274-278.
- Bejui-Thivolet F, Liagre N, Chignol MC, Chardonnet Y, Patricot LM. (1990) Detection of human papillomavirus DNA in squamous bronchial metaplasia and squamous cell carcinomas of the lung by in situ hybridization using biotinylated probes in paraffin embedded specimens. *Hum Pathol*, 21:111-116.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. (1994) Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis*, 170: 1077-1085.
- Bonne-Andreac C, Santucci S, Clertant P, Tillier F. (1995) Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *J Virol*, 69:2341-2350.
- Bohlmeier T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, Shroyer KR. (1998) Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18:265-269.
- Bosch F, Xavuer, Manos M, Manos, Munoz Nubia, Sherman Mark, Jansen Angela M., Peto Julian, Schiffman Mark H., Moreno Victor, Kurman Robert, Shah Keerti V., (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nat. Cancer Int.*, 87:796-802.

- Bouda M, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Giannoudis A, Tsoli E, Danassi-Afentaki D, Foukas P, Kyroudi A, Laskaris G, Herrington CS, Kittas C. (2000) High risk HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. *Mod Pathol*, 13:644-653.
- Bouvard V, Storey A, Pim D, and Banks L. (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocyte. *EMBO*, 13:5451-5459.
- Capone, RB, Pai, SI, Koch, WM, Gillison, ML, Danish, HN, Westra, WH, Daniel, R, Shah, KV, and Sidransky, D. (2001) Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 6:4171-4175.
- Carr Jeanne, Gyorfı Tibor. (2000) Human papillomavirus epidemiology , transmission , pathogenesis. *Clin Lab Medic*, 20: 235-255.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, and Bernard HU. (1995) Analysis of genomic sequence of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol*, 69:3074-3083.
- Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Cintorino M, Santopietro R, Tosi P, Syrjanen K. (2000) Evaluation of HPV , CMV , HSV and EBV in esophageal squamous cell carcinoma from a high-incidence area of China. *Anticancer Res*, 20:3935-3940.
- Chen CJ, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Luh KT, Chao HH, Chen KW, Chen SG, Lai GM, Huang HH, and Lee HH. (1990) Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of lung cancer in Taiwan. *Anticancer Res*, 10:971-976.
- Chen SL, Han CP, Taso YP, Lee JW, Yin CS. Identification and typing of human papillomavirus in cervical cancers in Taiwan. *Cancer*, 1993, 72:1939-1945.
- Cheng Y-W, Chiou H-L, Sheu G-T, Hsieh L-L, Chen J-T, Chen C-Y, Su

J-M, Lee H. (2001) The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res*, 61:2799-2803.

Cheng Y-W, Hsien L-L, Lin P-P, Chen Chao-Pin, Chen Chin-Yi, Lin Ton-Sen, Su Jan-Ming and Lee H. (2001) Gender difference in DNA adduct levels among nonsmoking lung cancer patients. *Environ and Mol Mutagenesis*, 37:304-310.

Ciechanover A, Schwartz AL. (1994) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J*, 8:182-191.

Clavel CE, Nawrocki B, Bosseaux B, Poitevin G, Putaud IC, Mangeonjean CC, Monteau M, Birembaut PL. (2000) Detection of human papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by hybrid capture II: a study of 185 tumors. *Cancer*, 88:1347-1352.

Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. (1995) Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*, 147:545-560.

Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG 3rd, Durst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP. (1987) Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO*, 6:3745-3753.

Cullen Allison P, Reid Richard, Champion Michael, and Lörincz Attila T. (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*, 65:606-612.

Da J, Chen L, Hu Y. (1996) Human papillomavirus infection and p53 gene mutation in primary lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 18:27-29.

- Department of Health. (1996) The Executive Yuan Republic of China: General health statistics, in Healthy and Vital Statistics, Republic of China, Taipei, Taiwan, ROC, 88-111.
- De Gaetani C, Ferrari G, Righi E, Betteli S, Migaldi M, Ferrari P, Trentini GP. (1999) Detection of human papillomavirus DNA in urinary bladder carcinoma by in situ hybridization. *J Clin Pathol*, 52:103-106.
- Dipple A, Pigott MA, Agarwal SK, Yagi H, Sayer JM, and Jerina DM. (1987) Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature*, 327:535-536.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352:824-827.
- Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, Mortel R, McGowan L, Greenberg MD, Barnes WA, Sidransky D. (2002) Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11:3-6
- Donna Lavergne and Ethel-Michele De Villiers. (1999) Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinoma. *Int J Cancer*, 80:681-684.
- Dubrow R, and Wegman DH. (1984) Cancer and occupation in Massachusetts: a death certificate study. *Am J Indus Med*, 6:207-230.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. (1989) The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243:934-937.
- Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. (1992) Homologous sequence in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate

- internation with same set of cellularproteins. *J Virol*, 66:6893-6902.
- Elamin F, Steingrimadottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M. (1998) Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects:a novel method of detection. *Oral Oncol*, 34:191-197.
- Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. (1989) Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infection. *Obstet Gynecl*, 74: 950-954.
- Franceschi S, Doll R, Gallwey J, La Vecchia C, Peto R, Spriggs AI. (1983) Genital warts and cervical neoplasia: an epidemiological study.*Br J Cancer*, 48:621-8.
- Franco EL, Villa LL, Ruiz A. (1995) Transmission of cervical papillomavirus infection by sexual activity: Differences between high and lowoncogenic types. *J. Infect Dis.*, 172:756-763.
- Ekalaksananan T, Pientong C, Kotimanusvanij D, Kongyingoes B, Sriamporn S, Jintakanon D. (2001) The relationship of human papillomavirus (HPV) detection to pap smear classification of cervical-scraped cells in asymptomatic women in northeast Thailand. *J Obstet Gynaecol Res*, 27:117-124.
- Ernster VL. (1994) The epidemiology of lung cancer in women. *Annals of Epidemiology*, 4:102-110.
- Ewen ME. (1994) The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Metastasis Rev*, 13:45-66.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Wspling E, Stillman B, Galloway DA (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV 16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, 11:2090-2100.
- Galloway, D. A. (1992) Serological assays for the detection of HPV antibodies.. *IARC Sci Publ*, 119:147-161.

- Gao YT, Blot WJ, Zheng W, Ershow AG, Hsu CW, Levin LI, Zhang R. (1987) Fraumeni JF Jr. Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer*, 40:604-9.
- Gorgoulis AG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyrouti A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, Kittas C. (1999) Human papillomavirus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol*, 30:274-283.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancer. *J Nat. Cancer Int.*, 92:709-720.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris CC. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54:4855-4878.
- Hart KW, Williams OM, Thelwell N, Finder AN, Brown T, Borysiewicz LK, and Gelder CM. (2001) Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomavirus in clinical sample. *J Clin Microbiol*, 39:3204-3212.
- Hengstermann A, Linares L, Ciechanover A, Whitaker N and Scheffner M. (2001) Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:1218-1223.
- Hirai H, Sherr CJ. (1996) Interaction of D-type cyclins with a novel myb-like transcription factor, DMP1. *Mol Cell Biol*, 16:6457-6467.
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, Genka K. (1996) Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Pathol*, 49:810-817.
- Hochstrasser M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. (1996) *Cell*, 84:813-5.

- Honda R, Tanaka H and Yasuda H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, 420:25-27.
- Hsu YH, Wei TC, Horng IJ, Jan WC, Su IJ. (1997) Prevalence of human papilloma virus 16 or 18 in cervical cancer in Hualien, eastern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*, 13:315-319.
- Huang Shixuan, Afonina Irina, Miller Beth A. and Beckmann Anna Marie. (1997) Human papillomaviruses types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer*, 70:408-411.
- Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. (2002) Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem*, 277: 2923-2930.
- Iwamasa T, Miyagi J, Tsuchiko K, Kinjo T, Kamada Y, Hirayasu T, Genka K. (2000) Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract*, 196, 209-218.
- Jalal H, Sanders CM, Prmer SS, Scully C, Maitland NJ. (1992) Detection of human papillomavirus type 16 DNA in oral squamous from normal young adults. *J Oral Pathol Med*, 21:465-470.
- Janicek Mike F. MD, Averette Hervy E. MD. (2001) Cervical cancer : prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin*, 51: 92-114.
- Jentsch S, Schlenker S. (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*, 82:881-884.
- Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCane DJ. (1992) Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocyte. *J Virol*, 66:1329-1335.
- Jones DL, Alani RM, Munger K. (1997) The human papillomavirus E7

oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*, 11:2101-2111.

Karas Zbigniew and Poreba Elzbieta. (1998) HPV sequence in blood of patients with condyloma acuminata. *J Inves Derma*, 110:843-844.

Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M, Tanaka S, Sugimachi K. (2000) p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Cancer Res*, 60: 2753-2755.

Kenny JW. (1996) Differences in risk factors associated with genital human papillomavirus infections. *J Adv Nurs*, 23:1221.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380:79-82.

Kim SK. (1997) Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 853-859. Review.

Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Shindoh M, Fujino M, Akie K, Kato M, Fujinaga K, Kawakami Y. (1995) Human papillomavirus type 18 DNA and E6-E7 mRNA are detected in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Br J Cancer*, 71:344-349.

Koo LC, Ho JH. (1990) Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int J Epidemiol*, 19 Suppl 1:S14-23.

Lee MF, Chang MC, Wu CH. (1998) Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 63:265-270.

Lenner P, Dillner J, Wiklund F. (1995) serum antibody responses against human papillomavirus in relation to tumor characteristic, response to treatment, and survival in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res*, 55:253-258.

Immunol Immunother, 40:201-205.

Liaw KL, Hsing AW, Chen CJ, Schiffman MH, Zhang TY, Hsieh CY, Greer CE, You SL, Huang TW, Wu TC. (1995) Human papillomavirus and cervical neoplasia: a case-control study in Taiwan. *Int J Cancer*, 62:565-571.

Li Tao, Lu Ahe-Ming, Chen Ke-Neng, Guo Mei, Xing Hai-Ping, Mei Qiang, Yang Huai-Hua, Lechner John F. and Ke Yang. (2001) Human papillomavirus type 16 is an important infectious factor in the high incidence of esophageal cancer in Anyang area of China. *Carcinogenesis*, 22:929-934.

Liu HR, Xing LQ, Si JY. (1994) A study of human papillary virus infection by in situ hybridization and histopathology in squamous cell carcinomas of the lung. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 23: 299-301.

Liu, VW, Tsang, P, Yip, A, Ng, TY, Wong, LC, and Ngan, HY. (2001) Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 82:269-272.

Makowska W, Malejczyk M, Kapiszewska D, Nyckowska J, Wojcikiewicz E, Wroblewska B. (2001) Human papillomavirus in the laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Pol*, 55:263-266.

Matlashewski A, Banks L, Pim D and Crawford L. (1986) Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells. *Eur J Biochem*, 154:665-672.

Mckaign Rosemary G., HMP, Baric Ralph S., Olshan Andrew F. (1998) Human papillomavirus and head and neck cancer : epidemiology and molecular biology. 20:250-265.

Mendelsohn John et al. (1995) The molecular basis of cancer. Philadelphia: W.B. Saunders, 574.

Miasko A, Niklinska W, Niklinski J, Chyczewska E, Naumnik W,

- Chyczewski L. (2001) Detection of human papillomavirus in non-small cell lung carcinoma by polymerase chain reaction. *Folia Histochem Cytobiol*, 39:127-128.
- Minawaer, Ahmatjan A, Suzuk L. (2001) Detection of HPV type 16,18 infection and p53 protein overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 36:451-453.
- Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, Miura K. (1998) Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 18:4765-4768.
- Miyagi J, Tshako K, Kinjo T, Iwamasa T, Hirayasu T. (2000) Recent striking change in histological differentiation and rate of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung in Okinawa, a subtropical island in southern Japan. *J Clin Pathol*, 53: 676-684.
- Miyagi J, Kinjo T, Tshako K, Higa M, Iwamasa T, Kamada Y, Hirayasu T. (2001) Extremely high Langerhans cell infiltration contributes to the favourable prognosis of HPV-infected squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Histopathology*, 38:355-367.
- Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. (2001) Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 344:1125-1131.
- Münger Karl, R Basile John, Duensing Stefan, Eichten Alexandra, L Gonzalez Sonia, Grace Miranda, L Zacny Valeri. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, 20:7888-7898.
- Nakazato I, Hirayasu T, Kamada Y, Tshako K, Iwamasa T. (1997) Carcinoma of the lung in Okinawa, Japan: with special reference to squamous cell carcinoma and squamous metaplasia. *Pathol Int*, 47:

659-672.

Nishioka S, Fukushima K, Nishizaki K, Gunduz M, Tominaga S, Fukazawa M, Monden N, Watanabe S, Masuda Y, Ogura H. (1999) Human papillomavirus as a risk factor for head and neck cancers-a case-control study. *Acta Otolaryngol Suppl*, 540:77-80.

Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Pollanen R, Bloigu R, Vahakangas K, Paakko P. (1995) p53 protein accumulation and the presence of human papillomavirus DNA in bronchiolo-alveolar carcinoma correlate with poor prognosis. *Int J Cancer*, 64:424-429.

Palevfsky JM, Winkler B, Rabannus JP, Clark C, Chan S, Nizet V, Schoolnik GK. (1991) Characterization of in vivo expression of the human papillomavirus type 16 E4 protein in cervical biopsy tissues. *J Clin Invest*, 87:2132-2141.

Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. (1997) Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol*, 15: 1008-1012.

Papadopoulou K, Labropoulou V, Davaris P, Mavromara P, Tsimara-Papastamatiou H. (1998) Detection of human papillomaviruses in squamous cell carcinomas of the lung. *Virchows Arch*, 433:49-54.

Phelps WC, Howley PM. (1987) Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol*, 61: 1630-1638.

Piccini A, Storey A, Massimi P, Banks L. (1995) Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify multiple regions of the protein involved in binding to E1. *J Gen Virol*, 76:2909-2913.

Sagawa M, Saito Y, Endo C, Sato M, Usuda K, Kanma K, Takahashi S, Chin E, Sakurada A, Aikawa K, et al. (1995) Detection of human papillomavirus type 16, 18, and 33 DNA in stage I (pT1N0M0)

squamous cell carcinoma of the lung by ploymerase chain reaction. *Kyobu Geka*, 48:360-362.

Scheffner M. (1998) Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. *Pharmacol Ther*, 78:129-139.

Serraino D, Piselli P, and Scognamiglio P. (2001) Viral infections and cancer:epidemiological aspects. *J Biol Regul Homeost Agents*, 15: 224-228,.

Schiffman, M. H. and Brinton, L.A. (1995) The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*, Suppl 76:1888-1901.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314: 111-4.

Seavey SE, Holubar M, Saucedo LJ and Perry ME. (1999) The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19(ARF). *J Virol*, 73:7590-7598.

Shamanin V, Delius H, EM de Villiers. (1994) Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *J Gen Virol.*, 75:1149-1156.

Shah KV, Howley PM. (1990) Papillomavirus. *Fields Virology*, 1651.

Shibagaki I, Tanaka H, Shimada Y, Wagata T, Ikenaga M, Imamura M, Ishizaki K. (1995) p53 mutation, murine double minute 2 amplification, and human papillomavirus infection are frequently involved but not associated with each other in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1:769-773.

Shotelersuk Kanjana, Khonlakit Chonlakit, Sakdikul Sairoong, Pornthannakasem Wichai, Voravud Narin, and Mutirangura. (2000)

Epstein-Barr Virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clini Cancer Res*, 6:1046-1051.

Shyu JS, Chen CJ, Chiu CC, Huang SC, Harn HJ. (2001) Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan:an in-situ polymerase chain reaction approach. *J Surg Oncol*, 78:101-9.

Simoneau M, LaRue H, Fradet Y. (1999) Low frequency of human papillomavirus infection in initial papillary bladder tumors. *Urol Res*, 27:180-184.

Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, Haugen TH. (2000) Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 109:1069-1076.

Smith SE, Koegl M, Jentsch S. (1996) Role of the ubiquitin/proteasome system in regulated protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Chemistry*, 377:437-446.

Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pollanen R, Vahakangas K, Lehto VP, Paakko P. (1996) Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma. *Thorax*, 51: 887-893.

Syrjanen K, Syrjanen S, Kellorski J, Karja J, Mantyrjarvi R. (1989) Human papillomavirus (HPV) type 6 and 16 DNA sequences in bronchial squamous cell carcinomas demonstrated by in situ hybridization. *Lung*, 167:33-42.

Szabo I, Sepp R, Nakamoto K, Maeda M, Sakamoto H, Uda H. (1994) Human papillomavirus not found in squamous and large cell lung carcinomas by polymerase chain reaction. *Cancer*, 73:2740-2744.

Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. (2002) Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet*, 76:41-47.

- Takahashi A, Ogoshi S, Ono H, Ishikawa T, Toki T, Ohmori N, Iwasa M, Iwasa Y, Furihata M, Ohtsuki Y. (1998) High-risk human papillomavirus infection and overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus from Japan. *Dis Esophagus*, 11:162-167.
- Taso YP, Yang KY, Han CP, Yin CS, Yang YF, Chen SL. (1994) Genital human papillomavirus infections in Taiwan. *Int J Gynaecol Obstet.*, 44:39-45.
- Tekin MI, Tuncer S, Aki FT, Bilen CY, Aygun C, Ozen H. (1999) Human papillomavirus associated with bladder carcinoma? Analysis by polymerase chain reaction. *Int J Urol*, 6:184-6.
- Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Douagui H, Kleisbauer JP. (1995) Detection of human papillomavirus DNA in primary lung carcinoma by nested polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol*, 41:1093-1097.
- Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Castelnau O, Kleisbauer JP. (1996) Detection of human papillomavirus by polymerase chain reaction in primary lung carcinoma. *Bull Cancer*, 83:842-846.
- Thomas M, Banks L. (1998) Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, 10:2943-2954.
- Thomas M, Banks L. (1999) Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 protein from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*, 80:1513-1517.
- Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, Smith DI. (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res*, 60:5916-5921.
- Tierney Rosemary J., Ellis John R.M., Winter Heather, Kaur Satpal, Wilson Sue, Woodman Ciaran B.J. and Young Lawrence S. (1993) PCR for the detection of cervical HPV 16 infection: the need for standardization. *Int J Cancer*, 54:700-701.

- Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol*, 70:115-120.
- Tsao YP, Yang KY, Han CP, Yin CS, Yang YF, and Chen SL. (1994) Genital human papillomavirus infections in Taiwan. *Int J Gynaecol Obstetrics*, 44:39-45.
- Tseng HH, Wang JS, Kan YY. (1996) Human papillomavirus detection in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix in Taiwan. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 57:47-53.
- Tsuhako K, Nakazato I, Hirayasu T, Sunakawa H, Iwamasa T. (1998) Human papillomavirus DNA in adenosquamous carcinoma of the lung. *J Clin Pathol.*, 51:741-749.
- Van Ranst MA, Tachezy R, Delius H, and Burk RD. (1993) Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomavirus Rep*, 4:61-65.
- Welt A, Hummel M, Niedobitek G, Stein H. (1997) Human papillomavirus infection is not associated with bronchial carcinoma: evaluation by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J Pathol*, 181:276-280.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. (1990) Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248:76-79.
- Wheeler CM, Parmenter CA, Hunt MS. (1993) Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New Mexico Student Health Center. *Sex Transm Dis*, 20:286-289.
- Xing LQ, Liu HR, Si JY. (1993) Detection of human papillomavirus DNA

in squamous cell carcinomas of the lung by multiple polymerase chain reaction. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 16:275-277.

Yang SC, Jeng SN, Kang ZC and Lee H. (2000) 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 condition. *Chem Res Toxicol*, 13:1046-1050.

Yu ST, Wu MM, Li LM. (1993) Prevalence of human papillomavirus 16 and 18 in transitional cell carcinoma of bladder. *Chin Med J*, 106: 494-496.

Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. (1996) Inactivation of the cdk inhibitor p27^{KIP1} by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13:2323-2330.

Zhang X, Zhu Y, Li L. (1995) Point mutation of p53 and detection of human papillomavirus DNA in bronchogenic carcinoma. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 34:673-675.

Zhou JA, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. (1991) Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*, 181:203-10.

Zielinski GD, Snijders PJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, van der Linden HC, Runsink AP, de Schipper FA, Meijer CJ. (2001) HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer*, 85:398-404.

Zöchbauer-Müller Sabine, Adi F. Gazdar, and John D. Minna. (2002) Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol*, 64:681-708. Review.

Zur Huasen H. (1994) Human pathogenic papillomaviruses. Berlin: Springer- Verlag. 83-100.

Zur Hausen H. (2000) Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat. cancer Int.*, 92: 690-698.

Zur Hausen H. (1991) Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184:9-13.

廖國盟、陳建仁 (1997) 肺癌之流行病學特徵、危險因子及防治策略

中華衛誌 16:375-395.

捌、表與圖

Table 1. Summary of HPV infection rates in various tumors by different detection techniques.

Tumors	Patients no.	Positive	%	Methods	Patients Group	References
Bronchial carcinoma	34	4	11.8	PCR	China	Zhang et al., 1995
Bronchial carcinoma	38	0	0	ISH,PCR	German	Welt et al., 1997
Bronchial carcinoma	185	5	2.7	Hybrid Capture II assay	France	Clavel et al., 2000
Esophageal carcinoma	72	15	20.8	SB	Japan	Shibagaki et al., 1995
Esophageal carcinoma	123	37	30.1	ISH	Japan	Takahashi et al., 1998
Esophageal carcinoma	34	9	26.4	PCR	German	Donna et al., 1999
	29	10	34.5	PCR	China	
Esophageal carcinoma	75	17	22.7	PCR	Japan	Kawaguchi et al., 2000
Esophageal carcinoma	103	6	5.8	ISH	Filand	Chang et al., 2000
	101	17	16.8	PCR		
Esophageal carcinoma	206	82	39.8	ISH	China	Tao et al., 2001
	206	124	60.2	PCR		
Bladder cancer	65	34	52.8	PCR	China	Yu et al., 1993
Bladder cancer	46	23	50.0	PCR	Italy	Agliano et al., 1994
Bladder cancer	55	0	0	PCR	UK	Boucher et al., 1996
Bladder cancer	42	2	4.8	PCR	Turkey	Tekin et al., 1999
Bladder cancer	43	17	39.5	ISH	Italy	De et al., 1999
Bladder cancer	187	16	8.5	PCR	Canada	Simoneau et al., 1999
Bladder cancer	52	19	36.5	NISH	China	Yu et al., 1999
Bladder cancer	50	23	46.0	ISH	Egypt	Khaled et al., 2001
Bladder cancer	16	0	0	ISH	Netherlands	Westeriend et al., 2001
Bladder cancer	91	0	0	ISH	South Africa	Sur et al., 2001
Head and neck cancer	98	23	23	PCR	Japan	Mineta et al., 1998

Table 1. Continued.

Tumors	Patients no.	Positive	%	Methods	Patients Group	References
Head and neck cancer	74	12	16.2	PCR	Japan	Nishioka et al., 1999
Head and neck cancer	154	20	13	NPCR	Greece	Gorgoulis et al., 1999
Head and neck cancer	253	62	25	PCR	USA	Gillison et al., 2000
Head and neck cancer	53	48	91	NPCR	Greece	Bouda et al., 2000
Head and neck cancer	23	10	43.5	Hybrid Capture II Assay	Japan	Makowska et al., 2001
Head and neck cancer	160	15	9	PCR	Europe	Mork et al., 2001
OSCC	28	14	50	PCR	UK	Elamin et al., 1998
OSCC	45	22	48.9	PCR	China	Minauaer et al., 2001
Laryngeal cancer	44	11	25	PCR	USA	Smith et al., 2000
Laryngeal cancer	42	15	35.7	PCR	Italy	Almadori et al., 2001
Colorectal cancer	50	0	0	PCR	USA	Shah et al., 1992
Colorectal carcinomas	107	48	44.9	PCR,SB	Taiwan	Cheng et al., 1995
Coloretal Adenomas	109	31	28	PCR,SB	Taiwan	Cheng et al., 1995
Colorretal cancer	19	16	84	PCR	Taiwan	Lee et al., 2001

The abbreviations used in this table are:

OSCC:oral squamous cell carcinoma

PCR:polymerase chain reaction

ISH:*in situ* hybridization

NISH:non-isotope in situ hybridization

SB:southern blot

Table 2. Summary of HPV prevalence in Pap smears from Taiwanese women with different diseases.

Case no.	Positive	%	Control no.	Postive	%	Method	References
Cervical cancer							
43	31	72	-	-	-	PCR	Chen et al.,1993
45	24	53.3	-	-	-	ISH	Tseng et al.,1996
40	28	70	-	-	-	PCR	Hsu et al.,1997
69	22	31.9	-	-	-	PCR	Lee et al.,1997
85	52	61.2	-	-	-	ISPCR	Shyu et al.,2001
30	21	70	80	17	21	Hybride II capture assay	Sun et al.,2002
15	13	86.7	12	0	0	PCR	Pao et al.,1997
35	18	51.4	12	0	0	PCR	Pao et al.,1999
CIN II, III and Cervical cancer							
48	-	92	261	-	9	PCR	Liaw et al.,1995
CIN I							
40	-	54					
Condyloma							
15	12	80	289	36	12.5	SB	Tsao et al.,1994

The abbreviations used in this table are:

PCR:polymerase chain reaction

ISPCR:*in situ* PCR

SB:southern blot

Table 3. Summary of HPV DNA detection in lung cancer from different studies by different detection techniques.

Study locations	Detetion methods	Patient no.	Positive	(%)	References
Filand	ISH	131	12	9.2	Syrjanen et al., 1989
France	ISH	43	7	16	Bejui-Thivolet et al., 1990
Beijing	PCR	49	7	14.2	Xing et al., 1993
Germany	PCR	85	0	0	Shamanin et al., 1994
Japan	PCR	47	0	0	Szabo et al., 1994
Beijing	PCR	49	7	14.2	Liu et al., 1994
	ISH	49	5	10.2	
Japan	PCR	36	3	8	Kinoshita et al., 1995
Japan	PCR	8	1	12.5	Sagawa et al., 1995
UK	PCR	66	6	9.1	Al-Ghamdi et al., 1995
Beijing	PCR	34	4	12	Zhang et al., 1995
France	PCR	31	5	16	Thomas et al., 1995
Filand	ISH	22	8	36	Nuorva et al., 1995
Beijing	PCR	40	20	50	Da et al., 1996
Finland	PCR	43	13	30	Soini et al., 1996
Okinawa	PCR			79	Hirayasu et al., 1996
	NISH			53	
Niigata	PCR			30	
	NISH			20	
France	PCR	28	4	14.3	Thomas et al., 1996
Germany	PCR,ISH	38	0	0	Weit et al., 1996
Okinawa	PCR			79	Nakazato et al., 1997
USA	PCR	34	2	5.9	Bohlmeyer et al., 1998
Greece	ISH	29	11	39.4	Papadopoulo et al., 1998
Okinawa	NISH,PCR	23	18	78.3	Tsuhako et al., 1998
France	Hybrid	185	5	2.7	Clavel et al., 2000
Capture II assay					
Okinawa	PCR	41	25	80	Iwamasa et al., 2000
Poland	PCR	40	4	10	Miasko et al., 2001
Okinawa	PCR,NISH	59	29	49.2	Miyagi et al., 2001
Taiwan	PCR,NISH	141	77	54.6	Cheng et al., 2001
Turkey	NISH	26	3	11.5	Kaya et al., 2001

The abbreviations used in this table are: PCR:polymerase chain reaction

ISH:*in situ* hybridization

NISH:nonisotpoe *in situ* hybridization

Table 4. Summary of HPV prevalence in peripheral blood from different studies.

Case no.	Samples	Positive (N)	%	Methods	Locations	References
Cervical cancer						
25	blood cell	8	32.0	PCR-DNA	Taiwan	Pao et al., 1991
15	blood cell	12	92.3	PCR-E6 mRNA	Taiwan	Pao et al., 1997
Healthy donor						
42	blood cell	0	0	PCR-DNA	England	Jalal et al., 1992
Condyloma Acurcinata						
12	blood cell	11	91.7	PCR-DNA	Poland	Karas et al., 1998
Common warts						
6	blood cell	0	0	PCR-DNA	Poland	Karas et al., 1998
Healthy donor						
12	blood cell	0	0	PCR-DNA	Poland	Karas et al., 1998
Cervical cancer						
60	serum	12	20	PCR-DNA	Hong Kong	Liu et al., 2001
HNSCC						
65	serum	0	0	PCR-DNA	USA	Capone et al., 2000

Table 4. Continued.

Case no.	Samples	Positive	%	Methods	Locations	References
Cervical cancer 175	plasma	11	6.9	PCR-DNA	USA	Dong et al., 2002
Carcinoma in situ 57	plasma	1	1.8	PCR-DNA	USA	Dong et al., 2002
Healthy donor 60	plasma	1	1.7	PCR-DNA	USA	Dong et al., 2002

The abbreviations used in this table are:

HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma

PCR: polymerase chain reaction

Table 5. Characteristics and clinical parameters of lung cancer patients enrolled in this study.

Characteristics	Lung cancer patients	%
Total no. of patients	149	
Age (mean \pm SD)	63.68 \pm 12.20	
< 67	73	49.00
\geq 67	76	51.00
Range	32-89	
Gender		
Female	59	39.60
Male	90	60.40
Smoking status		
No	74	49.66
Yes	75	50.34
Tumor type		
AD	90	60.40
SQ	59	39.60
Tumor stage		
I	26	17.45
II	15	10.07
III	44	29.53
IV	64	42.95

AD : Adenocarcinoma

SQ : Squamous cell carcinoma

Table 6. Characteristics of noncancer controls enrolled in this study.

Characteristics	Noncancer controls	%
Total no. of patients	175	
Age (mean \pm SD)	65.73 \pm 9.65	
< 67	82	46.86
\geq 67	93	53.14
Range	38-92	
Gender		
Female	79	45.14
Male	96	54.86
Smoking status		
No	107	61.14
Yes	68	38.86

Table 7. Comparison of the characteristics between case and control subjects.

Parameter	Lung cancer cases (n = 149)	Noncancer controls (n = 175)	P
Age (mean \pm SD)	64.68 \pm 12.20	65.73 \pm 9.65	0.388
Gender			
Female	59	79	
Male	90	96	0.314
Smoking status			
No	77	107	
Yes	75	68	0.038
Tumor type			
AD	90	-	
SQ	59	-	-
Tumor stage			
I, II	41	-	
III, IV	108	-	-

The difference of age between lung cancer cases and noncancer controls was calculated by Wilcoxon rank sums test. The other status differences were calculated by χ^2 test.

AD: Adenocarcinoma, SQ: Squamous cell carcinoma

Table 8. Comparison between the HPV prevalences in peripheral blood samples of lung cancer patients and noncancer controls.

HPV type	Lung cancer cases (n = 149) (%)	Noncancer controls (n = 175) (%)	P
HPV 16			
Positive	78 (52.4)	22 (12.6)	<0.001
Negative	71 (47.7)	153 (87.4)	
HPV 18			
Positive	46 (30.9)	9 (5.1)	<0.001
Negative	103 (69.1)	166 (94.9)	

χ^2 test was used for statistical analysis.

Age adjust.

Table 9. Relationships between HPV DNA detected in peripheral blood from lung cancer patients and clinico-pathological parameters.

Clinico-parameter	HPV 16		HPV 18		P
	Positive (n=71) (%)	Negative (n=78) (%)	Positive (n=46) (%)	Negative (n=103) (%)	
Age (n=149)					
<67 (n=73)	33 (45.2)	40 (54.8)	12 (16.4)	61 (83.6)	0.715
≥67 (n=76)	38 (50.6)	38 (49.4)	34 (42.4)	42 (57.6)	0.166
P	0.558		0.001		
Gender (n=149)					
Female (n=59)	34 (57.6)	25 (42.4)	15 (25.4)	44 (74.6)	0.042
Male (n=90)	37 (41.1)	53 (58.9)	31 (34.4)	59 (65.6)	0.571
P	0.048		0.244		
Smoking status (n=149)					
No (n=74)	40 (54.1)	34 (45.9)	29 (28.4)	61 (71.6)	0.737
Yes (n=75)	31 (41.3)	44 (58.7)	25 (33.3)	50 (66.7)	0.068
P	0.120		0.513		
Tumor type (n=149)					
AD (n=90)	50 (55.6)	40 (44.4)	29 (32.2)	61 (67.8)	0.026
SQ (n=59)	21 (35.6)	38 (64.4)	17 (28.8)	42 (71.2)	0.528
P	0.017		0.660		
Tumor stage (n=149)					
I、II (n=41)	12 (29.3)	29 (70.7)	11 (26.8)	30 (73.2)	0.865
III、IV (n=108)	59 (54.6)	49 (45.4)	35 (32.4)	86 (67.6)	0.109
P	0.006		0.510		

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 10. HPV DNA detected in peripheral blood from noncancer controls with different of age, gender and smoking status.

Parameter	HPV 16		HPV 18		P
	Positive (n=22) (%)	Negative (n=153) (%)	Positive (n=9) (%)	Negative (n=166) (%)	
Age (n=175)					
<67 (n=82)	16 (19.5)	66 (80.5)	5 (6.1)	77 (93.9)	0.855
≥ 67 (n=93)	6 (6.5)	87 (93.5)	4 (4.3)	89 (95.7)	0.591
P	0.009		0.391		
Gender (n=175)					
Female (n=79)	7 (8.9)	72 (91.1)	3 (3.8)	76 (96.2)	0.582
Male (n=96)	15 (15.6)	81 (84.4)	6 (6.2)	90 (93.8)	0.919
P	0.179		0.322		
Smoking status (n=175)					
No (n=107)	12 (11.2)	95 (88.8)	7 (6.5)	100 (93.5)	0.331
Yes (n=68)	10 (14.7)	58 (85.3)	2 (2.9)	36 (52.9)	0.351
P	0.497		0.554		

Table 11. Multivariate logistic regression analysis of the risk of HPV prevalence in peripheral blood, age, gender, and smoking status of lung cancer patients.

Variables	Group unfavorable/Favorable	OR (95%CI)	P
HPV 16, 18	+/-	38.52 (5.15-288.17)	0.0004
Age	≥67/<67	0.72 (0.45-1.16)	0.1808
Gender	Male/Female	1.03 (0.31-2.00)	0.9318
Smoking status	Yes/No	1.54 (0.81-2.96)	0.1898

1. The OR of lung cancer incidence for HPV 16 DNA alone in peripheral blood was 6.51 (95% CI 3.73-11.38)
2. The ORs of lung cancer incidence for HPV 18 DNA alone in peripheral blood and smoking status were 9.23 (95% CI 4.25-20.04) and 2.08 (95% CI 1.05-4.11), respectively.
3. The medium of age of patients was 67 years old.

Table 12. Correlation of the HPV infection between peripheral blood and lung tumors in lung cancer patients.

HPV DNA in tumors (n = 70)	HPV DNA in blood (n = 70)		P
	Positive	Negative	
HPV 16	(n = 35) (%)	(n = 35) (%)	
Positive (n = 30)	22 (62.9)	8 (22.9)	
Negative (n = 40)	13 (37.1)	27 (77.1)	0.001
HPV 18	(n = 25) (%)	(n = 45) (%)	
Positive (n = 13)	2 (8)	11 (24.4)	
Negative (n = 57)	23 (92)	34 (75.6)	0.093

χ^2 test was used for statistical analysis.

Table 13. Correlation of the HPV infection between peripheral blood and Pap smear in lung cancer patients.

HPV DNA in Pap smear (n = 15)	HPV DNA in blood (n = 15)		P
	Positive	Negative	
HPV 16	(n = 12) (%)	(n = 3) (%)	
Positive (n = 12)	11 (91.7)	1 (33.3)	
Negative (n = 3)	1 (8.3)	2 (66.7)	0.022
HPV 18	(n = 3) (%)	(n = 12) (%)	
Positive (n = 0)	0 (0)	0 (0)	
Negative (n = 15)	3 (100)	12 (100)	ND

χ^2 test was used for statistical analysis.

ND: not determined

Table 14. Correlation of the HPV DNA and E6 mRNA in lung cancer patients.

HPV E6 mRNA(n = 62)	HPV DNA (n = 62)		P
	Positive	Negative	
HPV 16	(n = 54) (%)	(n = 8) (%)	
Positive (n = 39)	39 (72.2)	0 (0)	
Negative (n = 23)	15 (27.8)	8 (100)	<0.001
HPV 18	(n = 12) (%)	(n = 50) (%)	
Positive (n = 0)	0 (0)	0 (0)	
Negative (n = 62)	12 (100)	50 (100)	ND

χ^2 test was used for statistical analysis.

ND: not determined

Table 15. The differences in characteristics of study subjects in present and previous study.

Characteristics	Present Study (%)	Previous Study (%)
Total no. of patients	149	141
Age (mean \pm SD)	63.68 \pm 12.20	63.02 \pm 9.61
Gender		
Female	59 (39.6)	45 (31.9)
Male	90 (60.4)	96 (68.1)
Smoking status		
No	74 (49.7)	78 (55.3)
Yes	75 (50.3)	63 (44.7)
Tumor type		
AD	90 (60.4)	83 (58.9)
SQ	59 (39.6)	58 (41.1)
Tumor stage		
I	26 (17.5)	46 (32.6)
II	15 (10.1)	42 (29.8)
III	44 (29.5)	53 (37.6)
IV	64 (42.9)	-

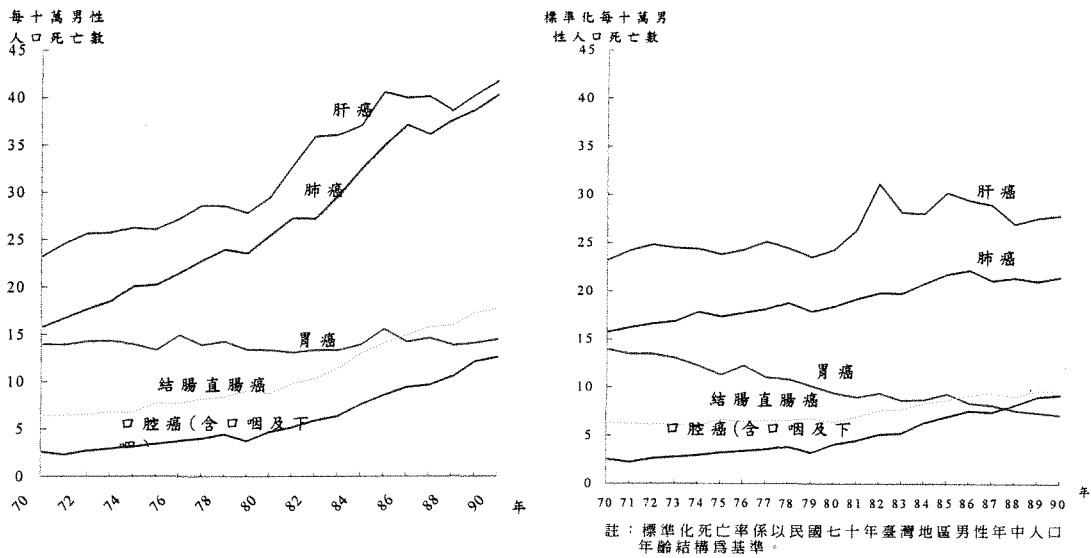
AD : Adenocarcinoma

SQ : Squamous cell carcinoma

Sample type in this study: peripheral blood

Sample type in the previous study: lung tumor tissue

臺灣地區男性主要癌症死亡率比較



臺灣地區女性主要癌症死亡率比較

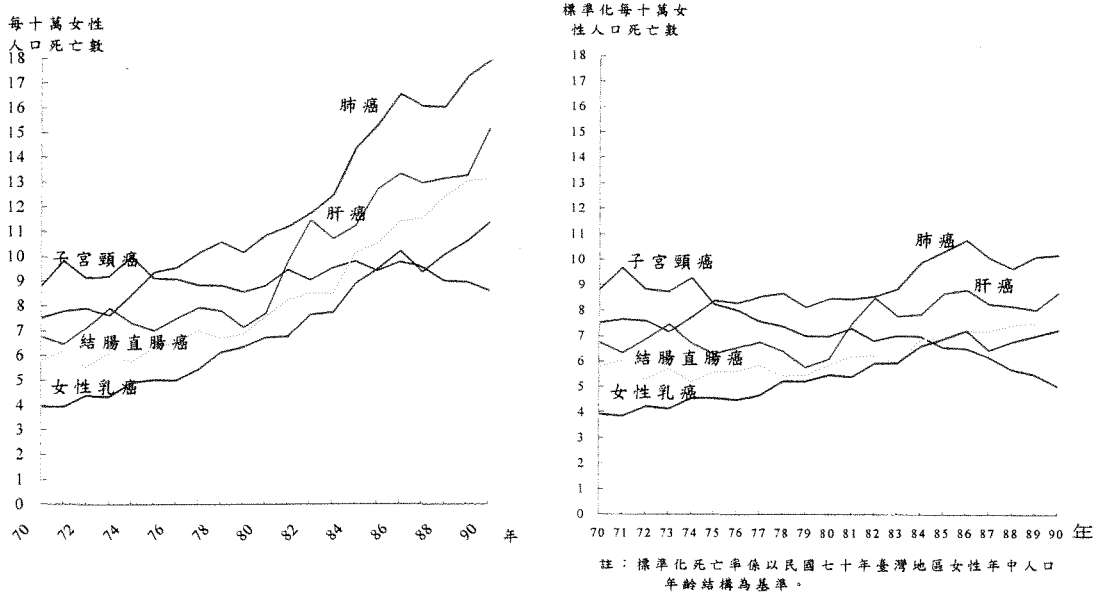


Fig 1. Cancer mortality rates of men and women in Taiwan.

(Department of Health, 2002)

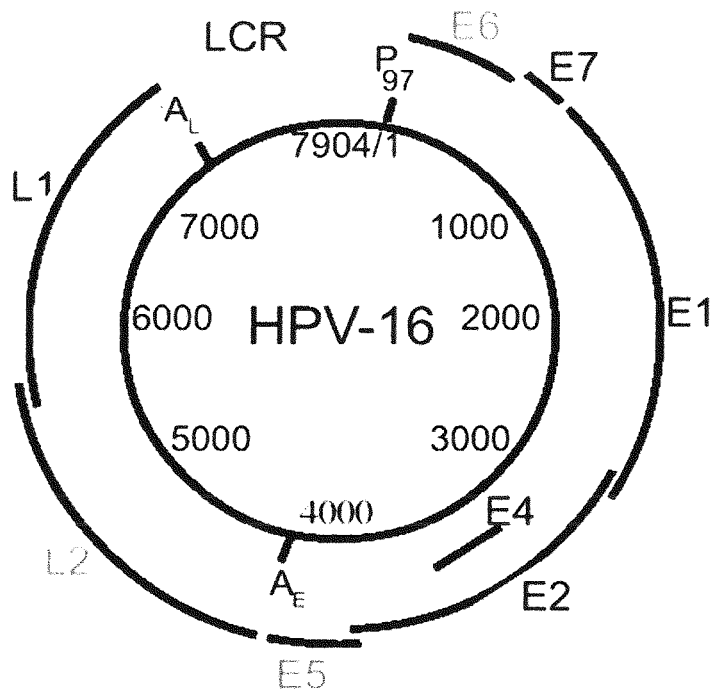


Fig. 2. The genomic map of HPV-16

(Howley PM et al., 1990)

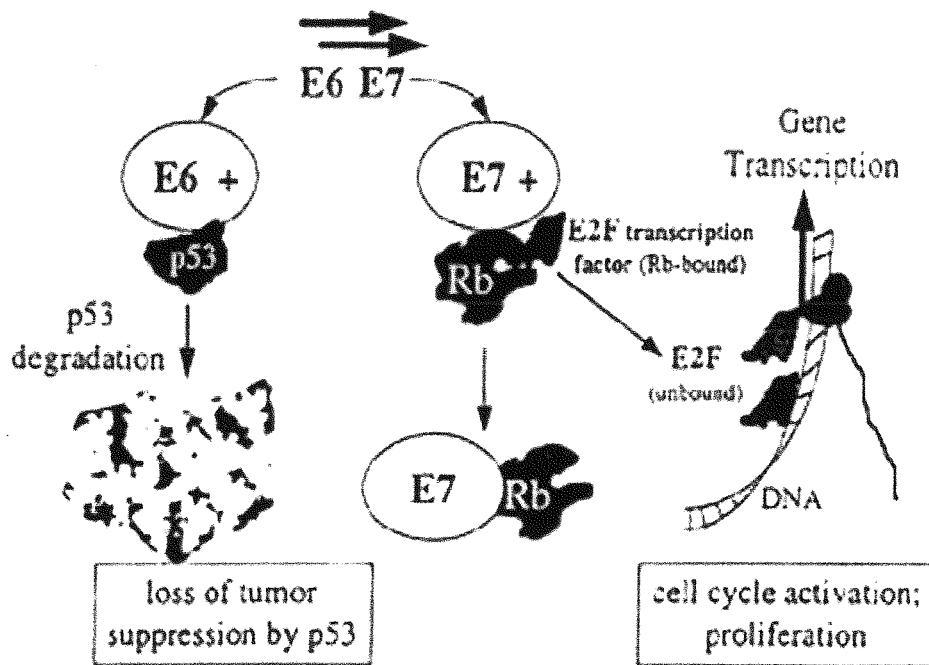
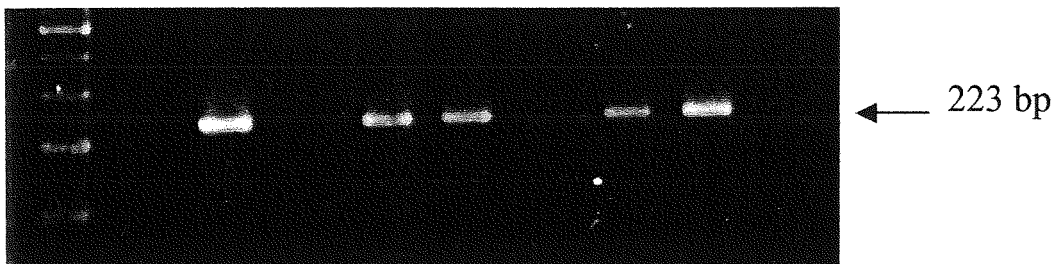


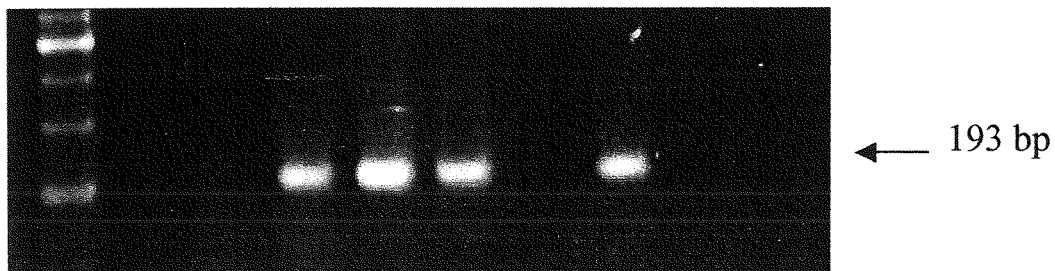
Fig. 3. The HPV-induced oncogenesis.

(Janicek et al., 2001)

(A) HPV 16



(B) HPV 18

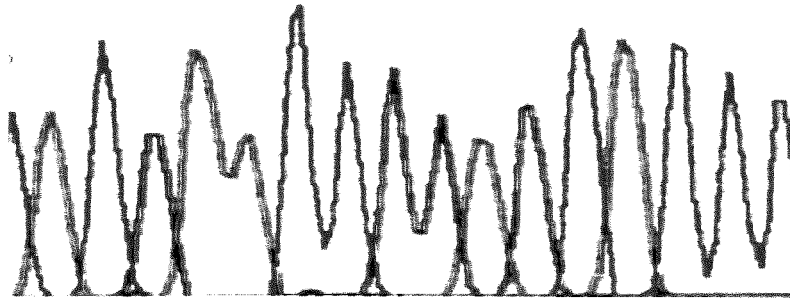


M N 1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 4. Representatives of positive and negative HPV 16 (A) and HPV 18 (B) DNA detected by nested-PCR in peripheral blood of lung cancer patients (Lanes 3-8). M, 100-bp ladder DNA marker. Lane 1, positive control; DNA of SiHa (Lane 1) or HeLa (Lane 2) cell line served as positive control for HPV 16 and 18, respectively. N, negative control, the DNA template was replaced by distilled water. β -actin served as an internal control with an expected size of 253 bp.

(A) HPV16

ATGAATTC CAC TAT TT
80 90



(B) HPV18

ACATGTCCTGCTATA
140 150

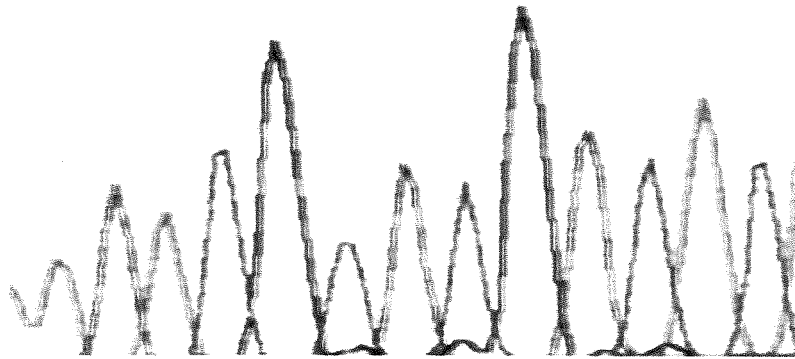


Fig. 5. A portion of HPV 16/18 DNA sequence analyzed by an autosequencer.

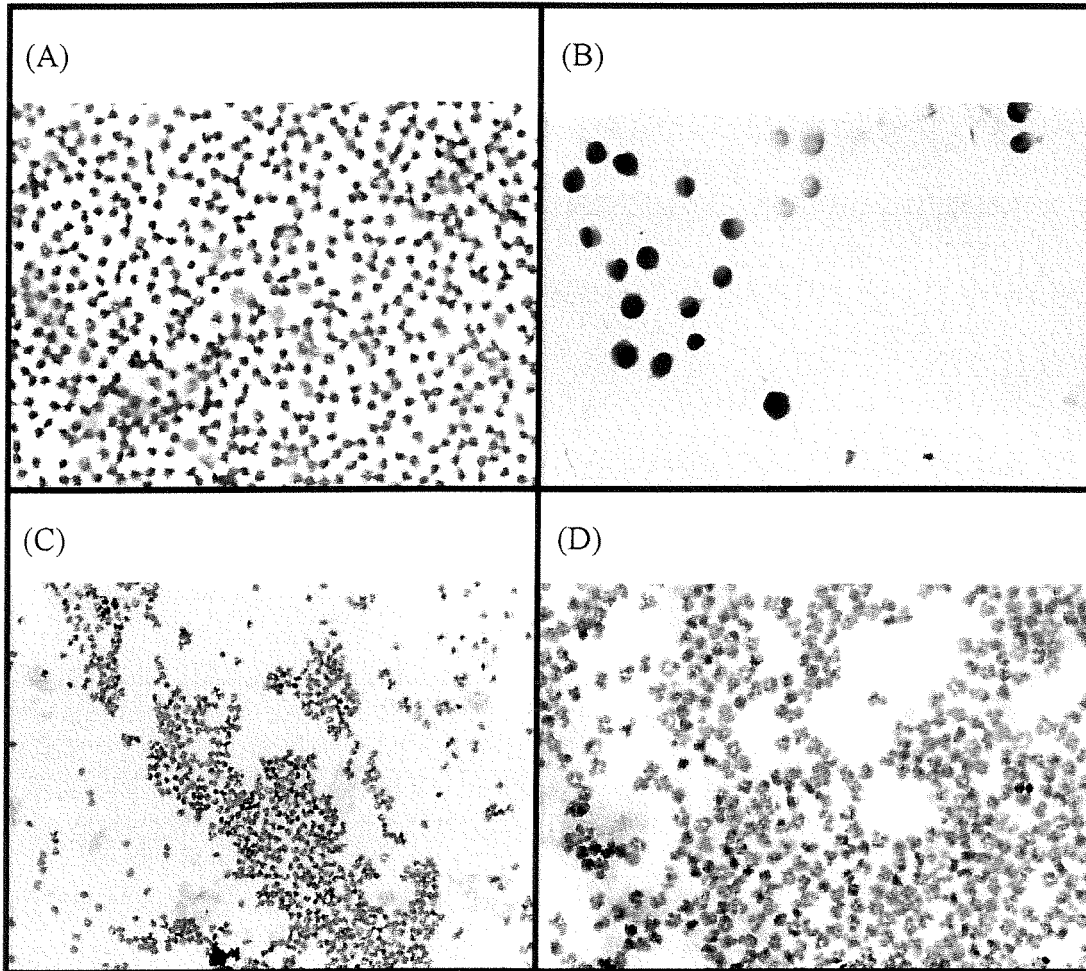


Fig. 6. Representatives of negative and positive ISPCR results for HPV 16/18 DNA detection in blood cells. (A) a negative control, (B) CaSki cells (HPV 16 positive), (C) blood cells of a HPV-positive lung cancer patient (200x), (D) blood cells of a HPV-positive lung cancer patient (400x) (Dr. Cheng Ya-Wen, personal communication).

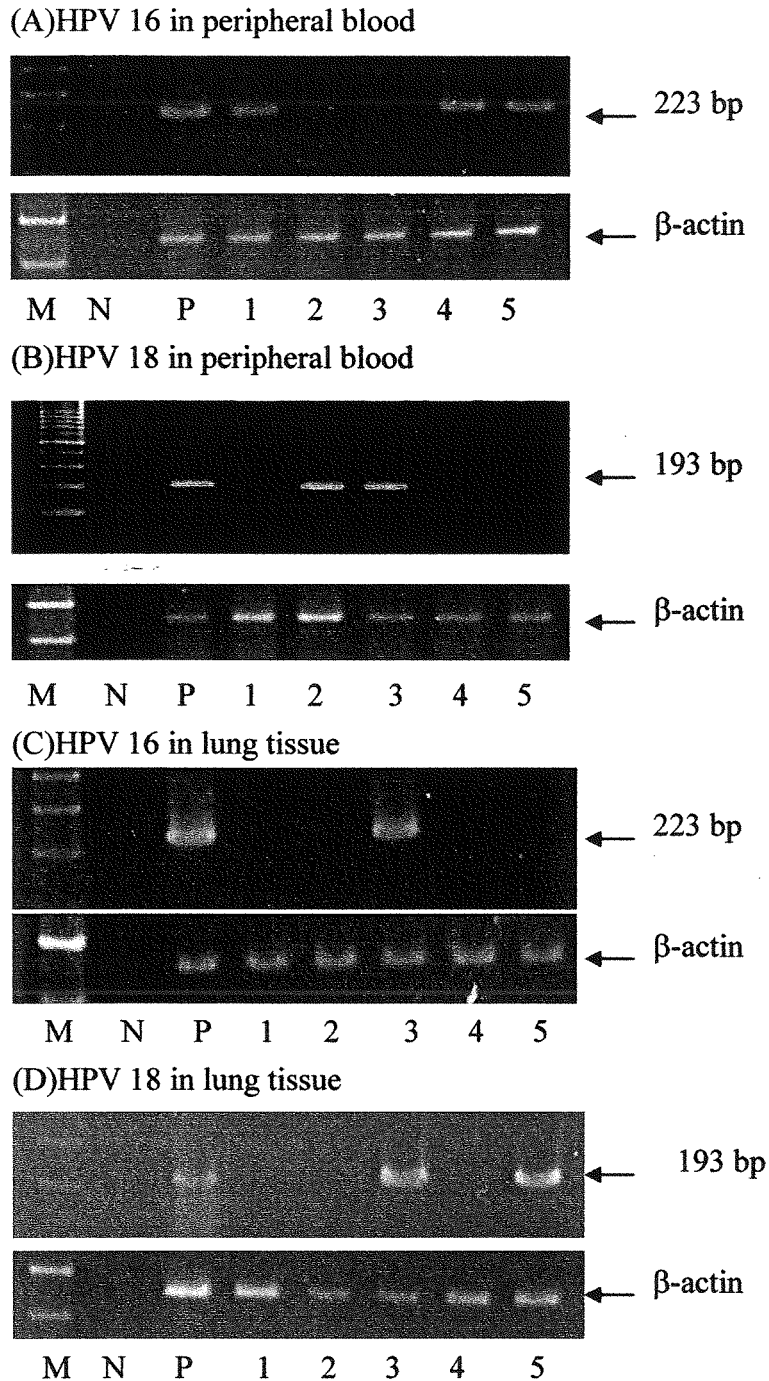


Fig. 7. Representatives of positive and negative HPV 16 (A,C) and HPV 18 (B,D) DNA detected by nested-PCR in peripheral blood and lung tissue of lung cancer patients (Lanes 1-5). M, 100-bp ladder DNA marker. P, positive control ;DNA of SiHa or HeLa cell line served as positive control for HPV 16 and 18 , repectively. N , negative control, the DNA template was distilled water. β -actin served as internal control with an expected size of 253 bp.

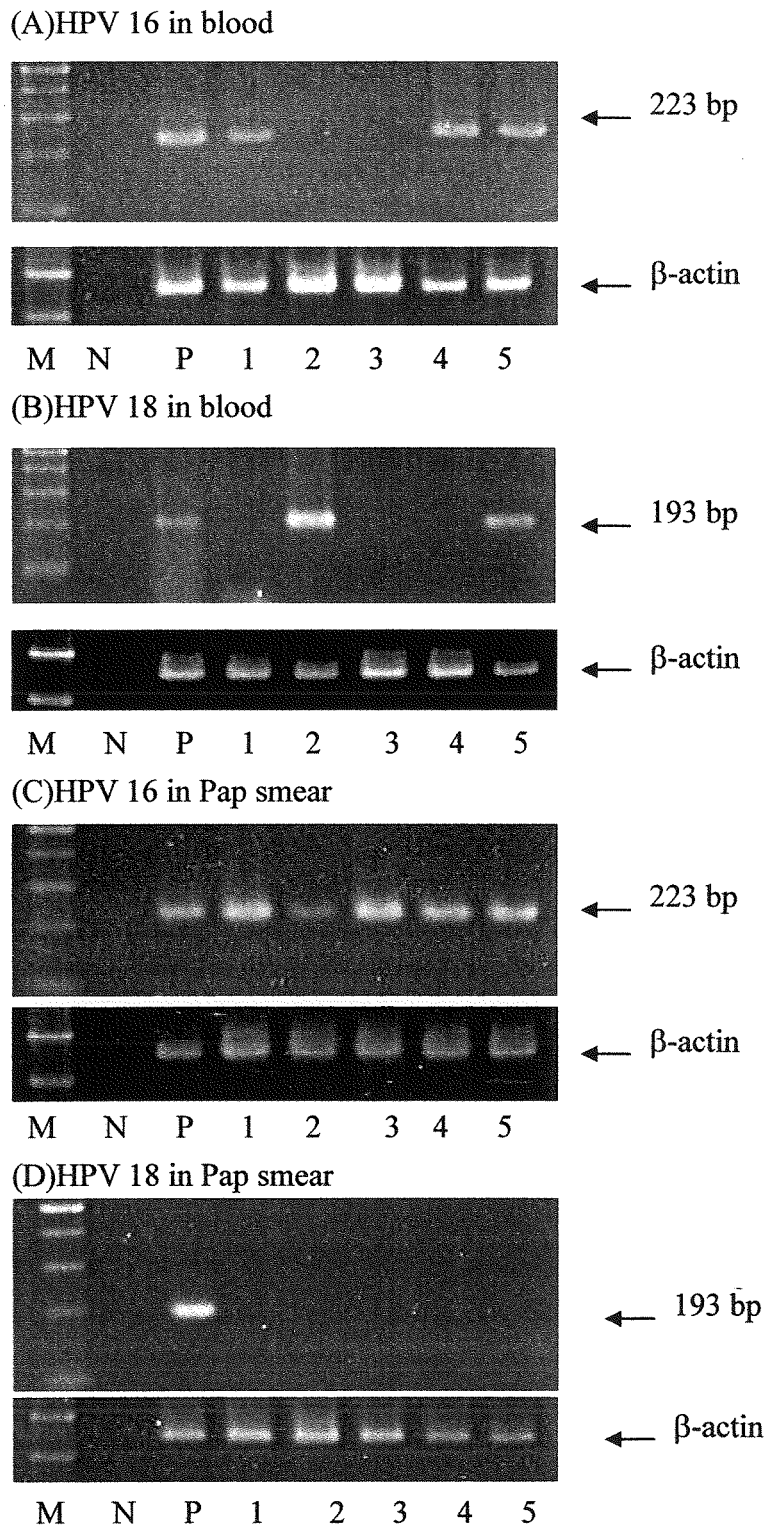
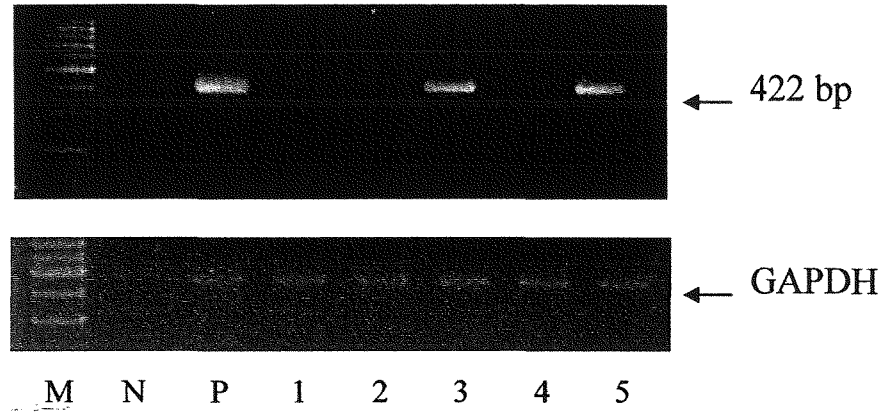


Fig. 8. Representatives of positive and negative HPV 16 (A,C) and HPV 18 (B,D) DNA detected by nested-PCR in peripheral blood and Pap smear of female lung cancer patients (Lanes 1-5). M, 100-bp ladder DNA marker. P, positive control ;DNA of SiHa or HeLa cell line served as positive control for HPV 16 and 18 , respectively. N , negative control, the DNA template was distilled water. β -actin served as a internal control with an expected size 253 bp.

(A) HPV 16 E6 mRNA



(B) HPV 18 E6 mRNA

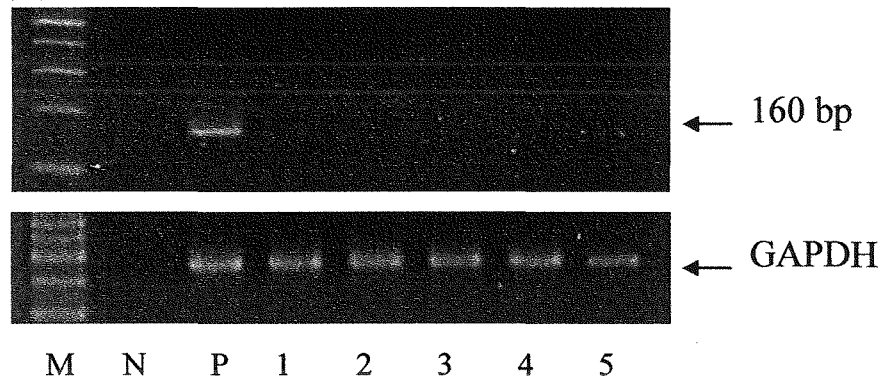


Fig. 9. Representatives of positive and negative HPV 16 E6 mRNA(A) and HPV 18 E6 mRNA(B) detected by nested-PCR in peripheral blood of lung cancer patients (Lanes 1-5). M, 100-bp ladder DNA marker. P, positive control ;cDNA of SiHa and HeLa cell line were served as positive control for HPV 16 and HPV 18 E6 mRNA, respectively. N , negative control, the mRNA template was distilled water.GAPDH serves as internal control with an expected size of 452 bp.

玖、英文摘要

Lung cancer, with the incidence rate increasing at a steady rate every year, is the leading cause of cancer death in Taiwan. Although cigarette smoking has been believed to be the major factors involved in lung carcinogenesis, most of female lung cancer patients in Taiwan were non-smokers. In our previous study, by looking at the prevalence rate of human papillomavirus (HPV), a powerful inactivator of p53 and close alliance to cervical cancer, in lung cancer patients, we have already revealed the association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among non-smoking Taiwanese women (Cheng et al., 2001). In this study, we wanted to further study the transmission route of HPV and assessed the feasibility of HPV DNA detection in the peripheral blood cells serving as a novel marker for lung cancer diagnosis. Nested PCR was employed to detect the presence of HPV viral DNA in peripheral blood cells of 149 lung cancer patients and 175 normal control subjects and the results showed that the prevalence rate of HPV 16 and HPV 18 in the peripheral blood cells of lung cancer patients was significantly higher than that of control subjects (for HPV 16, 52.4% vs. 12.6%, $P < 0.0001$; for HPV 18, 30.9% vs. 5.1%, $P < 0.0001$). Multivariate logistic regression analysis showed that individuals with HPV 16/18 co-infection had a OR of 38.52 of lung cancer compared to that of those with no HPV infection. The ORs of presence of HPV 16 and 18 DNA in peripheral blood cells of lung cancer patients were as high as 6.51 (95% CI 3.73-11.38; $P < 0.0001$) and 9.23 (95% CI 4.25-20.04; $P < 0.0001$), respectively, compared to 2.08 (95% CI 1.05-4.11; $P = 0.0351$) of smoking status. These results indicate that, not only for nonsmoking but also for smoking patients, the presence of HPV type 16/18 DNA in the peripheral blood cells may serve as a convenient risk biomarker of lung cancer. In another study, we already employed ISPCR (*In situ* PCR) to detect the presence of HPV DNA and the results showed that HPV DNA is indeed detectable in blood cells. Since the major infected target of HPV 16/18 is cervix and bloodstream is the only connection between lung tissue and cervix, we therefore hypothesized that HPV 16/18 infection detected in lung cancer tissues may be originated at cervix and then spread to lung tissue via bloodstream. We employed nested-PCR to simultaneously detect the presence of HPV in peripheral blood cells and lung tumor tissues of 70 lung cancer patients. The results

showed that there is a approximately 70 % concordance between HPV 16 DNA detection in peripheral blood cells and lung cancer tissue of lung cancer patients. However, the correlation, which was reached a statistical significance in the case of HPV 16 ($P=0.001$), was not observed in the case of HPV 18 ($P=0.096$). We also employed nested-PCR to simultaneously detect the presence of HPV in peripheral blood cells and pap smears of 15 female lung cancer patients. The results showed that the concordance of HPV 16 DNA being detected in peripheral blood cells and pap smear of lung cancer patients was approximately 86.7 %. The correlation in the case of HPV 16 was statistically significant ($P=0.022$). In conclusion, our present data clearly revealed a higher prevalence of HPV 16/18 DNA in the peripheral blood cells of lung cancer patients and may act as a risk biomarker of lung cancer. Furthermore, HPV 16 infection in peripheral blood cells may originate from cervix, and then spread to lung tissue via bloodstream.