

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

分項計畫二：肺癌之分子致病機制研究—HPV 感染之肺腺癌
的基因表現與染色體嵌入（子計畫三）

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-3112-P-040-002-Y

執行期間：91年05月01日至91年12月31日

執行單位：中山醫學大學毒理學研究所

計畫主持人：李輝

計畫參與人員：鄭雅文

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 12 日

行政院國家科學委員會基因體醫學國家型計畫

九十一年度研究計畫成果半年報(期末報告)

(自 91 年 5 月 至 91 年 12 月止)

總計畫名稱：臺灣肺癌基因體研究及臨床應用：

著重於女性肺腺癌

子計畫名稱：HPV 感染之肺腺癌的基因表現與染色體嵌入

計畫編號：NSC 91-3112-P-040-002

研究起訖：九十一年五月一日至九十一年十二月三十一日

申請機構：中山醫學大學毒理所

主持人：李輝

職 稱：教授兼所長

聯絡電話：04-24759400

電子郵件：hl@csmu.edu.tw

聯絡人：李輝

傳 真：04-24720407

填表日期：九十二年一月十四日

註：請依規定時程繳交，一式四份

目錄	1
一、摘要	2
1. 中文摘要	2
2. 英文摘要	4
二、本文	6
1. 前言	6
2. 材料與方法	12
3. 結果與討論	18
4. 結論與建議	23
5. 參考文獻	24
6. 圖與表	27

一、摘要

1. 中文摘要

肺癌自民國七十一年開始一直是台灣癌症的第一大死亡原因。已知抽煙是肺癌發生的重要病因，但是台灣地區女性有 90% 以上是不抽菸者。因此不抽者罹患肺癌之病因學研究，是當前我國重要的醫藥衛生研究課題。最近本研究室發現不抽煙女性肺癌患者的高危險性人類乳突瘤病毒 16 和 18 型(human papillomavirus 16/18) 的感染率遠高於男性肺癌患者。且 HPV 16/18 可能透過 E6/E7 致癌蛋白去活化 p53 和 Rb 蛋白之致癌路徑而參與肺癌形成。為了確定 HPV 感染確實參與肺癌之形成，本計畫選取有和沒有 HPV 感染之各兩個第一期女性肺腺癌腫瘤組織，進行 LCM-9600 spots - cDNA microarray 分析，並比較 interferone-related genes, NF-kB-related 和 cell-cycle and DNA synthesis related genes 等三類與 HPV 感染相關之基因表現在 HPV 感染與沒有感染之費腫瘤間是否有顯著差異？結果發現 HPV 感染之肺腫瘤組織在調控細胞週期、訊號傳遞以及轉錄調控因子相關基因的表現大部分高於沒有 HPV 感染之肺腫瘤組織，而在免疫相關基因的表現上則相反。因此肺腫瘤組織中 HPV 感染可能會改變免疫功能，並促進細胞增生的能力進而促進肺腫瘤化。為確定 HPV 確實參與肺腫瘤化，需提出 HPV DNA 會嵌至肺細胞之染色體，本研究選取先前以

in situ RT-PCR 確定會表現 HPV E6 或 E7 mRNA 的 15 個肺腫瘤組織
進行 RS-PCR 及 DNA 自動定序分析以了解 HPV 嵌入人類染色體之
位置，至今完成分析的初步結果顯示，HPV 嵌入的位置主要在 X 染
色體及 1 號染色體。以上初步結果進一步確定 HPV 感染確實會參與
台灣不抽煙女性肺癌患者肺癌之形成。

2. 英文摘要

Lung cancer is the leading cause of cancer death in Taiwan since 1982. Cigarette smoking is considered to be the most risk factor of lung cancer. However, a half of lung cancer cases in Taiwan were not explained by cigarette smoking, especially for Taiwanese women because 90% of women are nonsmokers. Therefore, the aetiological studies of nonsmoking lung cancer is an important medical issue in Taiwan. Our recent report indicated that high prevalence of HPV 16/18 infections in nonsmoking female lung tumors compared with nonsmoking male and smoking male cases may be as a risk factor of lung cancer in Taiwanese women nonsmokers. To verify HPV infections were involved in lung tumorigenesis, LCM-cDNA microarray analysis was performed to compare the different gene expression profiles including interferon-related genes, NF-kB-related genes, and cell-cycle and DNA synthesis related genes, between two pairs of HPV-infected and non-infected stage I-female lung adenocarcinomas. Our results showed that cell-cycle and DNA synthesis related genes, and NF-kB-related genes in HPV-infected tumors were significantly up-regulated compared with non-infected lung tumors. However, interferon-related genes were down-regulated in HPV-infected lung tumors compared with non-infected tumors. These results suggest HPV infection may alter expression of genes that influence of immune function and tumor progression. To further verify HPV infection is involved in lung tumorigenesis, 15 lung tumors with HPV E6 and/or E7 mRNA expressions that have been confirmed by in situ-RT-PCR, were performed

by RS-PCR and direct DNA sequencing to elucidate HPV DNA integrated chromosome locations in lung tumor tissues. Our preliminary data showed that HPV DNA was integrated at Xp11.3-11.4, Xp22.31-22.13, and chromosome 1. The putative novel genes will be further verified whether are involved in HPV-associated lung tumorigenesis.

二、本文

1. 前言

根據衛生署統計資料顯示，自民國七十一年以來，惡性腫瘤一直是國內十大死亡原因之首位（衛生署、生命統計, 1984-2000）。而 15% 至 20% 癌症死亡人數是由肺癌所造成的。1955 年台灣地區男性與女性中，每十萬人口中分別有 2.67 人和 1.25 人是因罹患肺癌而導致死亡，然而 1991 年台灣男女性肺癌死亡率已經升高為每十萬人中有 25.42 人及 10.85 人（衛生署、生命統計, 1984-1992），在這不到四十年的時間中，肺癌的死亡率已經增加了十倍之多，而這樣的增加速度是所有惡性腫瘤中最為顯著的。在惡性腫瘤的死亡率中，女性以肺癌為第一大致死原因，而男性為第二位，僅次於肝癌，而肝癌在每十萬人的死亡率僅較肺癌高不到二人（衛生署、生命統計, 2000）。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。

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。

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。

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。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，是值得重視的研究課題。

最近本研究室發現不抽煙之女性肺癌患者有高達 60%和 73%的高危險性人類乳病毒 16 和 18 型(human papillomavirus 16/18) 的感染率。此感染率遠高於男性肺癌患者 (HPV 16, 24%; HPV 18, 26%)。因此推測 HPV 16/18 高感染率可能與不抽菸的台灣婦女罹患肺癌有相關。且在肺腫瘤病理連續切片上，分別進行 in situ RT-PCR 和免疫組織化學分析，了解 HPV16/18 E6 和 E7 mRNA 是否和 p53 以及 Rb 蛋白之去活化有關，初步結果發現有 80% 以上有 E6/E7 mRNA 的腫瘤切片中的 p53 和 Rb 蛋白無法被染出，反之則 p53 和 Rb 蛋白則會被染到。這結果暗示 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。為了更明確證明 HPV 參與肺癌形成，本計畫擬以有和沒有 HPV 感染之女性第一期肺腺癌之肺癌組織，用 Laser capture microdissection (LCM)將肺腫瘤細胞取下，並萃取出 mRNA 進行 cDNA microarray 分析，比較分析 HPV 感染和不感染之肺癌組織的基因表現與圖依據 Nees et al., 2001 的研究區分為四類，即有關調控細胞週期、訊號傳遞、免疫反應以及轉錄調控因子選出 50-100 種基因，製成 cDNA 晶片，以建立具有 HPV 感染之肺癌患者的基因表現與圖。

此外，許多體外實驗顯示人類乳突瘤病毒嵌入宿主的基因後，會

促使 HPV E6、E7 的表現，進而誘使細胞的變態轉型作用 (Durst et al., 1991)。此外嵌入狀態之 HPV 具有持續性，游離狀態的 HPV 病毒則會隨著培養細胞子代代數的增加而逐漸減少 (Joen et al., 1995)。在體內實驗的結果亦指出 HPV 嵌入的狀態會隨病程的惡化而逐漸增加 (Das et al., 1992)。如果是良性壞死，HPV 是以 episomal DNA 形式存在，當發展至入侵性癌症時，則嵌入宿主 DNA 中 (Widebrauk et al., 1993)。不論是 HPV16 或是 HPV18 均有嵌入的狀況 (Cullen et al., 1991)。就嵌入位置而言，有些研究指出，HPV 容易在染色體的側翼 (fragile site)、致癌基因 (oncogene)、以及染色體斷裂處 (cancer chromosome breakpoints) 附近發生嵌入 (Cannizzaro et al., 1988)。最近的研究也指出 HPV DNA 的嵌入會造成宿主細胞基因的不穩定。因此本計劃亦將進一步分析 HPV DNA 的嵌入情形，以進一步證明 HPV 感染與台灣不抽煙女性肺癌形成之相關性。

2. 材料與方法

2.1 檢體收集

本研究所選取的非小細胞肺癌組織由台中榮民總醫院胸腔外科所提供，檢體收集自 1993 年到 2001 年之間進行手術的肺癌病患，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。組織取出後立即存放於-80°C 冰箱，以便日後分析之用。

2.2 腫瘤組織之 RNA 萃取

組織之 RNA 萃取方式為將以 LCM 取得之腫瘤及非腫瘤細胞以 TRIzol 水解細胞，於室溫反應 10 分鐘，加入 200 μ l chloroform 混合均勻離心後取上清液。以 500 μ l isopropanol 室溫反應 15 分鐘沈澱 RNA，12,000 rpm 離心 15 分鐘倒掉上清液，加入 500 μ l 75% 酒精洗去殘留的鹽類，離心留下

RNA 沈澱物溶於 DEPC H₂O。RNA 濃度之測定是以紫外線光譜儀測定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值應在 1.7 到 1.9 之間。若比值小於 1.7 則表示蛋白含量過高，應再以 proteinase K (10 μg/μl) 於 56°C 處理 30 分鐘後重複上述萃取步驟；若比值大於 1.9 則表示 DNA 含量過高，則應再以 DNase I (10U) 於 37°C 處理 30 分鐘處理後重複上述萃取步驟。RNA 的濃度以下列的公式計算：RNA (i g/ml) = A₂₆₀ × 40 × 稀釋倍數，並以 RNA denature gel 確認 18S 及 28S rRNA 的存在，以確認 RNA 的品質，RNA 的品質確認後才進一步進行 mRNA 之純化。

2.3 cDNA 之合成

mRNA 純化是以 QIAGEN mRNA 純化試劑進行純化方法試劑所附之流程。取 2 μg mRNA 以 random hexamer 為 primer，於 72°C 反應 10 分鐘，使 random hexamer 接合到 RNA 模板上 (mRNA 2 μg, 50mM random primer 6 μl 及 plant mRNA 0.2 μl)。此步驟中加入的植物的 RNA 主要用來做為合成 cDNA 效率之 internal control。再加入 10 μl 反轉錄酵素反應 buffer 及 5 μl 0.1M DTT, 2 μl 1mM

DIG-11-dUTP, 1 μ l 25 mM (dATP, dCTP, dGTP), 1 μ l 2mM dTTP 及 2.5 μ l Rnasin (10U/ μ l) 在 42°C 下作用 2 分鐘。再加入 1 μ l 反轉錄酵素 (reverse transcriptase), 在 42°C 下作用 90 分鐘後於 94 °C 作用 5 分鐘以終止反應。加入 5.5 μ l 3M NaOH 於 50°C 作用 30 分鐘。加入 5.5 μ l 3M CH₃COOH 於 50°C 作用 30 分鐘。加入 34 μ l H₂O, 5 μ l LPA (5 μ l/ μ l), 50 μ l 7.5M NH₄Oac 及 380 μ l 100% ethanol 於 -80°C 作用 30 分鐘。12,000rpm 離心 20 分鐘。加入 500 μ l 75% 酒精洗去殘留的鹽類, 離心留下 cDNA 沈澱物溶於 6 μ l H₂O, 儲存於 -80°C 冰箱備用。

2.4 cDNA microarray

Hybridization buffer 1 ml + 10 μ g salmon sperm DNA 於 95°C 作用 5 分鐘後立刻放置於冰上。Hybridization buffer: 20 \times SSC 10ml, 1% N-larryolsarcosine 4ml, 10% SDS 80 μ l, BM blocking powder 0.4g 及 H₂O 25.56 ml。將此反應液與生物晶片於 Hybridization oven 中以 60°C 反應 1.5 小時。反應完後加入以處理之 probe 15 μ l (cDNA 6 μ l, 10 μ g/ μ l polyA 0.5 μ l, 10 μ g/ μ l Cot-1 0.5 μ l, 2 \times hybridization buffer 1 μ l 及 H₂O

1) 於 95°C 作用 5 分鐘，反應完後 probe 放在 70°C 備用。將此 probe 與生物晶片 (membrane) 一起於 63°C 作用 3-4 小時。以 10× 體積的 2× SSC/0.1% SDS 清洗 membrane, 於室溫反應 5 分鐘後加入新的 10× 體積的 2× SSC/0.1% SDS 重複此步驟 2 次。以 10× 體積的 0.1× SSC/0.1% SDS 清洗 membrane, 於室溫反應 5 分鐘後加入新的 10× 體積的 0.1× SSC/0.1% SDS。重複此步驟 2 次。加入 blocking reagent 於室溫反應 1 小時 (blocking reagent: blocking dilution buffer 4ml, 20% dextran sulfate 0.5ml 及 10× blocking reagent 0.5ml)。加入 1^0 Ab (Anti-DIG-AP 1:1000 於室溫反應 1 小時。以 1× TBS 於室溫清洗三次。加入 NBT/BCIP 呈色，於室溫反應 10 分鐘。以 1× TBS 於室溫清洗三次。將 membrane 以 3,000dpi 解析度之掃描器將圖掃進電腦，並以分析軟體分析各個基因的表現量是否有差異。各個基因的表現量以高於或低於控制組兩倍者為有差異之表現，各實驗均以獨立三次實驗結果為基準以減少實驗誤差，而每張晶片間之 house-keeping gene 的表現量誤差應小於 10%。

2.5 cDNA microarray 數據分析

將實驗所得之 membrane 以解析度 3,000dpi 之掃描器將圖形掃。以分析軟體 gpix2demo 將呈色後之 9,600 點基因表現數據化。以 housekeeping gene 的表現校正樣品間基因表現的差異，每個樣本重複三次，誤差應小於 $\pm 10\%$ 。將實驗組與對照組數據比較，將基因表現差 ± 2 倍以上的基因挑出以便進行迷你晶片之製備。

2.6 RS-PCR

將手術取下之組織以福馬林固定並以石蠟包埋，以 5 μm 的厚度將組織切片，並以 H & E 染色並請病理科醫師區別出腫瘤細胞，將腫瘤細胞挑至含有 50 μl 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 μl ，置於 56°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 μl 的滅菌水中用於 PCR 反應。HPV DNA 的測定先以 ROS 及 Primary RS-PCR primer 為 primer 進行 PCR 反應，再以 ROS 及 Nested RS-PCR primer 為 primer 進行第二次 PCR 反應判定是否有

HPV 嵌入之情形，並以 Sequence primer 進行嵌入之序列分析。

Primer 的序列如下：

ROS primer:

BamHI:

5'TAATACGACTCACTATAGGGNNNNNNNNNNGGATCC 3'

EcoRI:

5'TAATACGACTCACTATAGGGNNNNNNNNNNGAATTC 3'

Sau3AI:

5'TAATACGACTCACTATAGGGNNNNNNNNNNGATC 3'

TaqI:

5'TAATACGACTCACTATAGGGNNNNNNNNNNTCGA 3'

HPV specific primers:

Primary RS-PCR:

HPV16-790-24D 5'ACAAAGCACACACGTAGACATTTCG 3'

HPV16-1545-26D 5'AGTAATAAATCAACGTGTTGCGATTG 3'

HPV16-2386-25D 5'TTTGGTTACAACCATTAGCAGATGC 3'

HPV16-2929-24D 5'GTGCCAACACTGGCTGTATCAAAG 3'

HPV16-5156-27U 5'TACCAATTCTACTGTACCTAATGCCAG 3'

HPV16-5883-27U 5'ACTTATTGGGGTTCAGGTAAATGTATTC 3'

HPV16-6686-25U 5'AGTAGATATGGCAGCACATAATGAC 3'

HPV16-7591-22U 5'GTTGGCAAGCAGTGCAGGTCAG 3'

Nested RS-PCR:

HPV16-790-25D 5'CGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGG 3'

HPV16-1587-26D 5'GGACTTACACCCAGTATAGCTGACAG 3'

HPV16-2414-26D 5'AATAGGTATGTTAGATGATGCTACAG 3'

HPV16-2964-25D 5'ACAAGCAATTGAACTGCAACTAACG 3'

HPV16-5121-25U 5'GAGGTTAATGCTGGCCTATGTAAAG 3'

HPV16-5850-28U 5'CCCTGTATTGTAATCCTGATACTTTAGG 3'

HPV16-6651-25U 5'TGCGTGTAGTATCAACAACAGTAAC 3'

HPV16-7524-26U 5'TTAAACCATAGTTGCTGACATAGAAC 3'

Sequence primer:

HPV16-839-25D 5'TCTGTTCTCAGAAACCATAATCTAC

3' HPV16-1677-26D 5'
 GGAATGGTTGTGTTACTATTAGTAAG 3'
 HPV16-2443-24D 5' CCTGTTGGAACTACATAGATGACA
 3'
 HPV16-2995-28D 5'
 ACAATATATAACTCACAATATAGTAATG 3'
 HPV16-5069-27U 5'
 GAGCTATATTAATACTATTATCATTAC 3'
 HPV16-5774-23U 5' TCCAAGTCAAGTAGTCTGGATG 3'
 HPV16-6587-24U 5'CTGTGCTCGTTGTAACCAATAAGG 3'
 HPV16-7467-24U 5'CATGCAACCGAATTCGGTTGAAGC 3'

3. 結果與討論

過去本研究室已發現不抽煙之女性肺癌患者有高達 60% 和 73% 的高危險性人類乳病毒 16 和 18 型 (human papillomavirus 16/18) 的感染率。此感染率遠高於男性肺癌患者 (HPV 16, 24%; HPV 18, 26%)。又以 *in situ* RT-PCR 分析結果發現 HPV16/18 E6/E7 mRNA 的表現與 p53 及 Rb 蛋白之去活化有關。並進一步以 western blot 和 immunoprecipitation 分析證實 E6 和 E7 mRNA 與蛋白表現一致。因此推測 HPV 16/18 感染率可能參與肺癌之形成。

為了進一步釐清 HPV 的感染是否確實參與女性肺癌形成，本計劃選用兩組 HPV16/18 有感染且表現 E6/E7 兩種致癌蛋白者 (HPV+) 及完全沒有 HPV 感染 (HPV-) 之肺癌患者之腫瘤組織切片，其臨床基本資料如 Table 1 所示。首先利用 LCM (Laser capture microdissection) 分別擷取有 HPV 感染及沒有 HPV 感染之腫瘤細胞及非腫瘤細胞並抽取其 mRNA，經 *in vitro* transcription 將 mRNA 放大後進行 cDNA microarray 的分析比較。本研究之初步成果主要將表現差異較大之基因依據 Nees et al., 2001 的研究區分為四類，分別是：Cluster I: INF-related gene；Cluster II：NF- κ B related gene；Cluster III：Cell cycle related gene and DNA synthesis related gene；Cluster IV：Other，結果如 Table 2 所示。Cluster I: INF-related gene，在 microarray 的分析結果中此類基因在 HPV+ 與 HPV- 的腫瘤組織中表現量之比值範圍從 0.10-3.03，其中僅 MHC class II 及 serine protein inhibitor, kazal type I 兩者表現量增加，其餘皆隨 HPV 16/18 E6/E7 之表現而有抑制之現象；而在過去的研究中也發現高危險型 HPV 確實會抑制 INFs 及 INF-response 基因的表現 (Nees et al., 2001; Chang et al., 2000)。Cluster II：NF- κ B related gene，已知 NF- κ B 基因受 TNF- α 所調控，TNF- α 可活化 NF- κ B 及 AP1 等轉錄因子，

並進而刺激許多與發炎反應有關之基因表現，如 IL-6 及 IL-8。過去有研究指出 HPV 16 E6 會抑制 NF- κ B 的活性進而抑制免疫反應 (Patel et al., 1999)。而在本研究之結果中共選取 17 個此類基因表現差異較大者，範圍從 0.18- 4.00，此部份基因有 58.8% (10/17) 在 HPV 致癌蛋白表現者有被抑制的現象，因此肺腫瘤組織中 HPV 16/18 E6/E7 致癌蛋白的表現確實會影響細胞之免疫功能。Cluster III：Cell cycle related gene and DNA synthesis related gene，過去的許多研究結果發現高危險型之 HPV 所表現之 E6 及 E7 蛋白會使細胞中兩個重要的細胞週期調控因子 p53 及 Rb 去活化，進而促使細胞的分化及增生而終致細胞癌化 (EL Deiry et al., 1998; Foster et al., 1996)。本研究結果顯示，40 個選取的基因中有 60% (24/40) 在有 HPV 感染之肺腫瘤之表現量較沒有感染之肺腫瘤有增加的現象，這結果顯示 HPV 感染確實會影響細胞週期之調控。而 Cluster IV：Other，此類主要包括膜蛋白及結構蛋白等而此部份選取之基因亦有 66.7% (6/9) 被抑制，主要影響細胞間物質交換之通道及細胞之結構，但詳細之機轉仍需進一步研究。

過去的研究結果指出 HPV E6 及 E7 mRNA 在子宮頸癌的形成過程中有隨腫瘤惡化或細胞分化而增加的現象(zur Hausen et

al., 1994), Nees 等人(2001) 的研究指出在 cervical keratinocyte 中轉植入 HPV E6/E7 時會造成 INF related gene 的表現量下降，並使細胞週期調控的相關基因之表現量下降，這與本研究所得之研究結果相似。已知 STAT1 是 ISGF 家族成員中的一員，HPV E6 蛋白表現會使 STAT1 蛋白的表現量下降，IFN 及 IFN-induced gene 的表現主要受 STAT1-ISRE 複合物所調控，當 STAT1 蛋白表現量下降，IFN 基因的表現亦受到影響 (Nees et al., 2001)。HPV E7 亦會藉由與 IGSF3 家族中的 p48 結合，而影響 IFN 的表現量 (Barnard et al., 1999)。而在本研究中亦可看到同樣的現象，IFN 相關基因在 HPV 感染之肺腫瘤組織中的表現量遠低於 HPV 沒有感染之肺腫瘤組織，因此 HPV 感染可能透過 INF pathway 而抑制細胞的免疫反應。

此外，有研究指出 HPV E7 會與 E2F 競爭 Rb 而使 E2F 釋放出來 (Nees et al., 2001)，E2F 為一轉錄因子，調控許多與細胞週期有關之基因的表現，在本研究結果中發現，40 個選取的基因中有 60% (24/40) 在有 HPV 感染之肺腫瘤之表現量較沒有感染之肺腫瘤有增加的現象，這結果顯示 HPV 感染確實會影響細胞週期之調控，而促進細胞之分化及增生。

過去在子宮頸癌的研究指出，HPV 容易在染色體的側翼

(fragile site)、致癌基因(oncogene)、以及染色體斷裂處(cancer chromosome breakpoints) 附近發生嵌入(Cannicaro et al., 1988)。

Thorland 等人(2000) 的研究指出 HPV 16 主要嵌入在 common fragile sites，如：FRA6C 及 FRA17B。Couturier 等人(1991) 也發現 HPV 會嵌入於 *c-myc* 基因(8q24.1)及 *n-myc* (2p24) 附近，而引起 *myc* 基因過分表現，而導致腫瘤的產生。本研究亦利用 RS-PCR 及 DNA 自動定序儀分析 HPV DNA 嵌入的位置，共分析到 5 個 HPV DNA 嵌入的位置，分析到的五個位置中有 3 個位於 X 染色體，2 個位於 1 號染色體，且皆位於 common fragile sites，為確定 HPV 感染確實參與肺癌之形成，本計畫又利用 RS-PCR 分析 HPV DNA 是否有嵌入宿主 DNA 之情形，結果如圖一所示。在分析的 18 位肺癌患者中包括，3 位 HPV E6-/E7-，4 位 HPV E6+/E7-，5 位 HPV E6-/E7+及 6 位 HPV E6+/E7+，結果發現除了 3 位 HPV E6-/E7-的肺癌患者其 HPV DNA 沒有發生嵌入情形外，其餘 15 位肺癌患者均可分析到 HPV DNA 的嵌入 (Table 3)。為進一步了解 HPV DNA 嵌入的位置，利用 DNA 自動定序儀將 RS-PCR 所分析到的片段加以定序，到目前為止，共分析到 5 個 HPV DNA 嵌入的位置，如 Table 4 所示。分析到的五個位置中有 3 個位於 X 染色體，2 個位於 1 號染色體，其中有 2 個位

置有重複的現象分別是 xp11.3-11.4 及 chromosome 1。但 xp11.3-11.4 及 chromosome 1 是否為 HPV 感染之肺癌患者最常見之嵌入位置及是否有其他的嵌入位置仍需進一步之分析研究。以上在肺腫瘤組織中發現的嵌入位置所影響之基因，在過去有關子宮頸癌之研究中均無報告過，都為未知基因，仍需進一步確定其基因序列和功能，以了解這些基因在肺腫瘤化中扮演何種角色？

4. 結論與建議

由以上初步結果已進一步證實 HPV16/18 E6/E7 蛋白表現確實會改變肺腫瘤組織的細胞增生和免疫功能基因的表現，這些基因之表現改變與 HPV 16 E6/E7 轉殖入 keratinocyte 細胞中造成細胞轉形的基因表現幾乎相似。另外又發現 HPV DNA 會嵌入到肺細胞之染色體中。因此本研究結果再次確定 HPV 感染

確實會參與肺癌之形成。

5. 參考文獻

- 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.
- Cannizzro LA, Durst M, Medez MJ, Hecht BK, Hecht F. Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites nears fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints.

- Cancer Genet Cytogenet, 33: 93-98, 1988.
- 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.
- Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical. *J Gen Virol*, 73: 2327-2336, 1992.
- Durst M, Bosch FX, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. *J Virol*, 65: 796-804, 1991.
- El Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol*, 8: 345-357, 1998.
- Foster SA, and Galloway DA. Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene*, 12: 1773-1779, 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.
- 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.

- 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.
- Iwamasa T, Miyagi J, Tsuchiko 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.
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank s, Miller L, and Woodworth GD. Papillomavirus type16 oncogenes down regulated expression of Interon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J virol*, 4283-4296, 2001.
- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integradation of human papillomavirus type16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*, 69: 2989-2997, 1995.
- 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.
- Patel D, Huang SM, Baglia LA, and McCane DJ. The E6 protein of human papillomavirus type16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*, 18: 5061-5072, 1999.
- Serraino D, Piselli P, and Scognamiglio P. Viral infections and cancer: epidemiological aspects. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 15 (3):224-228, 2001.
- 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.
- 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
- Van Ranst MA, Tachezy R, Delius H, and Burk RD. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomaviru Rep*, 4: 61-65, 1993.
- Widebrauk DL, Johnston, Sheryl LG. *Manual of clinical virology*. New York: Raven Press, 1993; 172-174.
- Yousem SA. Ohori NP. Sonmez-Alpan E. Occurance of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasmas. *Cancer*, 69 (3):693-697, 1992.
- Zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184 (1): 9-13, 1991.

6.圖、表

Table 1. Clinical parameters in stage I, Female, lung adenocarcinoma patients.

Patient no.	Age	T	N	M	HPV 16/18 E6/E7
436H	61	2	0	0	-
861B	48	2	0	0	-
265B	57	2	0	0	+
291A	48	2	0	0	+

Table 2. Summary of expression data in Cluster I to IV.

Gene name	HPV+/HPV-
-----------	-----------

Cluster I: INF-related gene

Major histocompatibility complex, classII	2.46
Serine protease inhibitor, Kazal type I	3.03
DNA fragmentation factor, 40 kD, beta subunit	0.18
DR1-associated protein 1	0.16
Fibroblast growth factor receptor 2	0.10
HNPP/nuclear phosphoprotein	0.78
STAT-induced STAT inhibitor	0.11
67-kDa guanylate binding protein 1	0.11
2'-5' Oligoadenylate synthetase E	0.20

Cluster II: NF- κ B related gene

Major histocompatibility complex, classII	2.46
Proteasome (prosome, macropain) subunit	3.72
Brain and reproductive organ-expressed	2.66
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	2.41
Tight junction protein 3 (zone occludens 3)	3.84
Serine protease inhibitor, Kazal type I	3.03
CD36 antigen	0.18
DNA fragmentation factor, 40 kD, beta subunit	0.18
FK506 binding protein 12-rapamycin association	0.19
Transmembrane protein 1	0.19
DR1-associated protein 1	0.16
Synaptosomal-associated protein, 23kD	0.15
Neutral sphingomyelinase (N-SMase)	0.18
Fanconi's anemia C	0.50
Tissue factor	0.68
Jun D	4.00
Vimentin	0.87

Cluster III: Cell cycle related gene and DNA synthesis related gene

Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	2.91
Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	2.54
Hypothetical protein	2.76
Brain and reproductive organ-expressed	2.66
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	2.41
Secretory carrier membrane protein 2	2.72
Tight junction protein 3 (zone occludens 3)	3.84

Protein tyrosine phosphatase	3.02
Spermidine synthase	3.46
Serine protease inhibitor, Kazal type I	3.03
Forkhead box F2	3.91
Zinc finger protein 200	3.44
Zinc finger protein 134	2.90
Zinc finger protein 228	2.70
FK506 binding protein 12-rapamycin association	0.19
Leukemia-associated phosphoprotein p18	0.18
Prostate cancer overexpressed gene 1	0.15
Transmembrane protein 1	0.19
Neutral sphingomyelinase (N-SMase)	0.18
Protease, serine, 21 (testisin)	0.16
3-primer-phosphoadenosine 5-primer-phosphatase	0.09
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2	0.15
Cofactor required for Sp1 transcription activator	0.19
Uridine phosphorylase	0.20
Topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)	5.00
Fanconi's anemia C	0.50
Ribonucleotide reductase M2	10.0
Glectin-1	10.0
Fibronectin 1	1.08
Tissue factor	0.68
Jun D	4.00
RNA binding motif protein8	3.01

Vimentin	0.88
Transcription factor AP-4	0.08
Activating transcription factor 3	0.10
Keratin 6	0.92
Cyclin B1	10.0
Polo-like kinase	10.0
Replication factor C 38 kDa	7.00
Cyclin A	10.0
Cluster IV: Other	
Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	2.44
Tublin, gamma 2	2.47
Hypothetical protein FLJ20411	0.19
Chromosome 19 open reading frame 3	0.16
Four and a half LIM domains 2	0.19
Pancreatic lipase-related protein 2	0.19
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasm membrane	0.17
ArsA arsenite transporter, ATP binding protein	0.18
Natyral killer cell protein 4	2.22

Table 3. HPV 16 DNA integration in lung tumors with E6 and/or E7

mRNA expressions.

HPV 16 E6/E7	No. of patient	HPV DNA integration (RS-PCR)
Negative/negative	3	Negative
Positive/ negative	4	Positive
Negative/ positive	5	Positive
Positive/ positive	6	positive

Table 4. HPV 16 DNA integration site in chromosome of lung tumors with E6 and/or E7 mRNA expressions.

HPV 16 E6/E7	Gender	Integration site in chromosome locus	Putative gene
+/+	F	Xp11.3-11.4	PAC95C20
+/+	F	Chromosome 1	RP11-477H21
+/+	F	Xp11.3-11.4	PAC95C20
-/+	F	Chromosome 1	RP11-147C23
+/+	M	Xp22.31-22.13	PHKA2

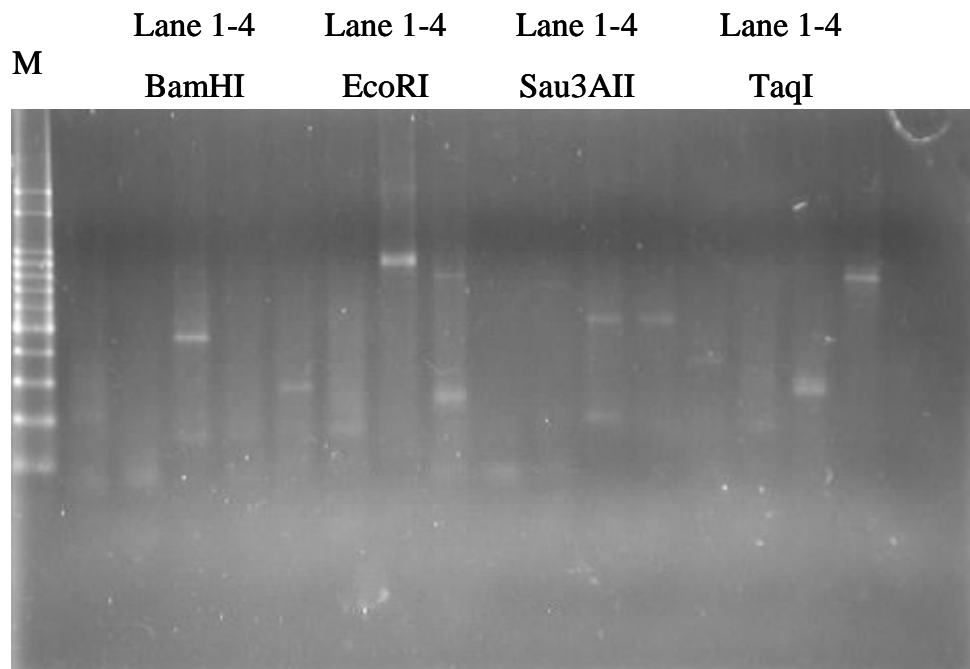


Fig. 1. The results obtained by RS-PCR for lung cancer patient. Each set of four lines used nested specific primers and the indicated RS-PCR primer. Lane M, 100bp ladder.