

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

鉻與鎳暴露對台灣不抽菸肺癌形成之可能性研究(第3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-027-MY3
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：李輝

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：邱育瑚
博士後研究：賴吉慶

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 100年09月14日

鉻與鎳暴露對台灣不抽菸肺癌形成之可能性研究

The possible contribution of chromium and nickel in lung
carcinogenesis among Taiwanese nonsmokers

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC-97-2314-B-040-027-MY3

執行期間：97 年 8 月 1 日至 98 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學研究所

計畫主持人：李輝

共同主持人：

計畫參與人員：邱育瑚、賴吉慶

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中華民國 2011 年 9 月 13 日

| | |
|--------------------|----|
| 目錄 | |
| 壹、中文摘要 | 1 |
| 貳、英文摘要 | 3 |
| 參、前言 | 4 |
| 一、肺癌之流行病學研究 | 4 |
| 二、鎳與癌症發生之相關性研究 | 4 |
| 三、鉻與癌症發生之相關性研究 | 5 |
| 四、鎳與鉻暴露之相關性研究 | 6 |
| 五、p53 抑癌基因與癌症相關性研究 | 7 |
| 六、EGFR 與癌症相關性研究 | 8 |
| 肆、材料與方法 | 10 |
| 一、檢體收集 | 10 |
| 二、重金屬分析 | 10 |
| 1. 樣本乾燥 | 10 |
| 2. 樣本消化 | 10 |
| 3. 石墨式原子吸收光譜儀之昇溫條件 | 11 |
| (a) 最佳化乾燥步驟 | 11 |
| (b) 最佳灰化條件 | 11 |
| (b) 最佳原子化條件 | 11 |
| 4. 添加基質修飾劑 | 12 |
| 5. 品保與品管 | 12 |
| 三、肺臟組織 DNA 萃取與純化 | 13 |
| 四、DNA 定序分析 | 14 |
| 1. 聚合酶鏈鎖反應 | 14 |
| (a) p53 基因 | 14 |
| (b) EGFR | 14 |
| 2. PCR 產物純化 | 15 |
| 3. DNA 定序 | 15 |
| 五、MGMT 和 XPC 甲基化分析 | 16 |
| 六、統計分析 | 17 |
| 伍、結果與討論 | 18 |
| 陸、參考文獻 | 21 |
| 柒、圖與表 | 31 |

壹、中文摘要

肺癌是台灣女性和男性癌症死因之第一和第二位。已知抽菸是肺癌的主要致病原因。歐美國家之肺癌患者大多為抽菸者 (>85%)，但是台灣有過半之肺癌患者為不抽菸者，因此抽菸並無法完全解釋台灣肺癌之發生。因此有些環境因子已發現與不抽菸之肺癌發生有關，例如二手菸、烹調油煙、蚊香和人類乳突病毒感染等。即使國際癌症研究機構認定鎳與鉻為已知人類致癌物，但是許多動物模式之研究並無法證實其致癌性，僅在一些職業醫學之流行病學研究發現與呼吸道癌症發生有關。本研究室在 case-control 研究發現，肺癌患者較非癌症患者之肺組織有較高之鎳與鉻的含量，推測鎳與鉻暴露可能與台灣肺癌之發生有關。另外有研究發現鎳與鉻都會抑制 DNA 修補能力而增加 p53 突變之頻率。本計畫為了釐清鎳與鉻之暴露，是否可能經由抑制 DNA 修補能力而增加 p53 和 EGFR 發生突變而參與肺癌之形成。本研究利用石墨式原子吸收光譜分析 184 位肺癌患者腫瘤週邊之正常肺組織中鎳與鉻之含量，同時利用 DNA 自動定序儀分析 p53 與 EGFR 基因之突變，並以統計分析鎳或鉻之含量是否與 p53 或 EGFR 基因突變有關？結果發現 p53 突變之患者的鎳或鉻含量顯著高於 p53 正常之肺癌患者 (7.8 ± 18.8 vs. 1.7 ± 4.5 , $P < 0.001$ for nickel; 10.5 ± 30.4 vs. 3.5 ± 5.7 , $P = 0.012$ for chromium)。但是在 EGFR 突變與否之患者間，鎳與鉻之含量並沒有差異。因此鎳含量高之肺癌患者較含量低之肺癌患者，有 3.21 倍 p53 發生突變之風險 (95% CI = 1.65-6.24, $P = 0.001$) 和 2.13 倍 EGFR 發生突變風險的趨勢 (95% CI = 0.88-5.17, $P = 0.094$)。本研究又發現鎳含量主要與不抽菸和女性患者之 p53 突變之發生有關。更有趣的是，鎳含量與女性患者之 EGFR 突變之發生有正相關性。而鉻含量則僅與不抽菸男性患者之 p53 突變有關，而與女性患者之 p53 以及 EGFR 突變都沒有相關性。已知 DNA 修補基因- XPC 和 MGMT 甲基化與 p53 突變有關。為了解 XPC 和 MGMT 甲基化是否會增強鎳暴露對 p53 發生突變之風險，本研究以 MSP 方法分析肺癌患者腫瘤組織之 XPC 與 MGMT 啟動子甲基化，結果發現鎳含量高/MGMT

甲基化之患者的 p53 突變之風險是鎳含量低/MGMT 甲基化患者的 7.21 倍，若相對於鎳含量高/沒有 MGMT 甲基化之患者的 p53 發生突變之風險為 2.65 倍，因此 MGMT 甲基化會增加鎳對 p53 發生突變之風險。總之，本計畫提出鎳暴露可能會經由增加 p53 和 EGFR 發生突變之風險而參與肺癌之發生，尤其是不抽菸之女性患者。

關鍵字：肺癌、鎳、鉻、p53、EGFR

貳、英文摘要

Our previous a case-control study showed that nickel and chromium accumulation in lung tissues may be associated with lung cancer incidence in Taiwan. Therefore, in the present study, we next investigated whether nickel and chromium exposure could contribute to lung cancer development via increased the occurrence of p53 and EGFR mutations. One hundred eighty-four adjacent normal lung tissues from lung cancer patients were enrolled for the determination of nickel or chromium contents by graphite atomic absorption spectrometry (GAAS). We determined p53 and EGFR mutations in lung tumors by direct sequencing. Our data showed that nickel and chromium contents in p53 mutated patients were significantly higher than in p53 wild-type patients. Therefore, patients with high nickel contents had 3.21- and 2.13-fold risk for the occurrence of p53 and EGFR mutations. However, the contents of both metals were not different between EGFR-mutated and –wildtype patients. More interestingly, nickel contents were positively correlated with EGFR mutations in female patients, and chromium contents were associated with p53 mutation in nonsmoking male patients, not with p53 and EGFR mutations in female patients. We further examines whether both gene promoter methylations could increase the risk of p53 mutation occurrence by nickel contamination. Our data showed that the risk of p53 mutation occurrence in patients with high nickel content was increased by MGMT promoter hypermethylation from 2.65 to 7.21-fold. Collectively, the results from this project appear to support nickel accumulation in lung tissues may contribute to lung cancer development via increased p53 and EGFR mutations, especially in nonsmoking female patients.

Keywords: lung cancer, nickel, chromium, p53, EGFR

叁、前言

一、肺癌之流行病學研究

肺癌是最主要腫瘤相關死亡原因之一；在台灣，根據行政院衛生署統計資料指出，惡性腫瘤高居國人十大死因之首，其中又以肝癌及肺癌分居惡性腫瘤相關死因之第一及第二位。直至 2010 年，台灣女性肺癌死亡率為 24.2%，而男性肺癌相關死亡率則為 46.9%。儘管預防醫學知識及技術逐漸進步、早期癌症診斷技術發達以及癌症相關治療方式與照顧進步，肺癌患者術後五年存活率仍低於 16% (Jemal et al)。儘管過去文獻認為長期抽菸為促使癌症發生最主要之因子，根據國際癌症研究中心研究結果顯示罹患肺癌之危險會隨著抽菸年數、每日抽菸量、抽菸深度以及焦油暴露量增高而增加 (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1986)。在西方國家的肺癌患者中 70-90% 為重度抽菸者 (Koo & Ho, 1990)，然而反觀台灣，根據國民健康局的研究資料指出台灣男性及女性抽菸率僅分別為 38.9% 以及 5.1%，而此抽菸比率遠低於西方國家之抽菸盛行率；此外，台灣男性肺癌患者半數以上終生未有抽菸習慣，特別的是女性肺癌患者 90% 以上並未具有抽菸史 (Ko et al, 1997)，另一方面，儘管台灣女性肺癌死亡率逐年增加，但台灣女性抽菸率卻無一致的增加趨勢 (Lee et al, 2000)。因此，在台灣相較於抽菸，其他因子，如中式烹調方式所產生含多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) 及異環芳香烴類化合物的油煙、二手菸暴露、汽機車排放廢氣、蚊香暴露以及感染具有抑制 p53 抑癌基因正常表現之 E6 蛋白的人類乳突瘤病毒 16/18 型等因子可能在肺癌發展過程中亦占有高度重要性 (Adamson et al, 1990; Bennett et al, 1999; Boffetta, 2006; Chen et al, 2008; Cheng et al, 2001; Cheng et al, 2007; Chiang et al, 1999; Chiang et al, 1997; Felton et al, 1986; Ohgaki et al, 1991; Sugimura et al, 1996; Sugimura & Sato, 1983)。

二、鎳與癌症發生之相關性研究

鎳為工業製程中廣泛運用的元素之一 (Kasprzak et al, 2003)。然而過去研究指

出，工人長期慢性於工作環境中吸入、食入或皮膚接觸工作環境中離散的鎳及其相關化合物會增加罹患心血管疾病、腎臟病變、肺部纖維化或呼吸道相關疾病發生風險 (Doll, 1958; Grimsrud et al, 2005; Kasprzak et al, 2003)，進一步根據國際癌症研究中心統計發現，電鍍業、礦業、合金淬煉、鎳精煉製程以及焊接工人為鎳暴露致癌的高風險工作族群。此外，過去文獻也指出中國倉鼠卵巢細胞氧化壓力會隨著鎳的暴露增加而有逐漸升高的趨勢 (Huang et al, 1994)；高濃度鎳處理淋巴細胞會促使 DNA-protein cross-link 與烷類鍵結至 DNA 現象增加 (Wozniak & Blasiak, 2002)。有鑑於流行病學研究發現，鎳的暴露會增加相關疾病與癌症發生風險；同時，鎳會促使動物及細胞調控失常，因此國際癌症研究中心將鎳化合物歸類為已知人類致癌物質 (Group 1)，而金屬鎳則歸類為可能人類致癌物質 (Group 2B)。過去觀察及測試鎳對動物及細胞代謝與影響，主要採用兩種不同型態的鎳，一種為非水溶性之鎳化合物 (water-insoluble nickel components of the dusts)，如 Ni_3S_2 或 NiO ；另一種則為水溶性鎳化合物 (water-soluble nickel components)，如 $NiSO_4$ 與 $NiCl_2$ ；在體內，非水溶性鎳化合物主要會經由吞噬作用包覆於吞噬囊泡中進入細胞，隨後鎳化合物會在吞噬囊泡的酸性環境作用下逐漸降解，最後形成鎳離子以及反應性氧化產物 (reactive oxygen species; ROS)(Kasprzak et al, 2003)，而水溶性鎳化合物則會經由簡單擴散、鈣離子通道主動運輸或與鐵離子競爭離子通道蛋白進入細胞內，而在此競爭通道過程中，鎳離子會間接促使細胞內離子平衡失調 (Kasprzak et al, 2003)；另一方面，進入細胞內的鎳離子會透過直接與蛋白質結合破壞蛋白質的正常調控 (Kasprzak et al, 2003)。儘管如此，詳細的鎳離子影響細胞調控過程及其作用目前仍未完全被清楚辨析。

三、鉻與癌症發生之相關性研究

在工業製程上，鉻主要運用於顏料製造、皮革加工、不鏽鋼材料與合金製造；根據職業流行病學統計發現，長期暴露於高濃度鉻散佈的工作環境之中會引起皮膚

潰爛、鼻中膈穿孔、喉嚨發炎以及肺癌發生風險 (Matos et al, 2000)。另一方面，細胞實驗也發現，鉻在細胞中由六價鉻還原至三價鉻的過程會產生高濃度反應性氧化產物促使細胞逐漸凋亡 (Ye et al, 1999)；此外，在電磁場共振 (electron paramagnetic resonance)與光譜學(UV / visible spectroscopy)分析發現，鉻的還原過程中間產物-五價鉻會直接與 DNA 鑰結，而此鑰結比率會隨著還原劑濃度增加而有增高趨勢，同時 DNA 單股斷裂與雙股斷裂比率亦具有逐漸升高之趨勢 (Mattagajasingh & Misra, 1999)。有鑑於職業流行病學的調查與細胞及動物實驗的觀察探討暴露到高濃度鉻的影響與風險，國際癌症研究中心在 1990 年將六價鉻歸類為已知人類致癌物 (Group 1)，而三價鉻則歸類為未知人類致癌物 (Group 3)。鉻為人體中必需金屬元素之一，主要藉由與蛋白質結合儲存於皮下組織、肝臟、肌肉以及脂肪組織之中，體內過多鉻會藉由尿液及糞便排出體外 (McCarty, 1980)。由於離子穩定性關係，當鉻進入人體後主要以三價鉻以及六價鉻型態存在，然而僅有六價鉻可以透過離子運輸進入細胞中。當六價鉻進入細胞後，會快速地在抗壞血酸、穀胱甘肽 (glutathione)或半胱胺酸還原催化作用下由六價鉻逐漸降解還原形成三價鉻 (O'Brien et al, 2003)；而此還原過程會產生反應性氧化產物以及反應性中間產物；在人體中，三價鉻會與甘胺酸、胱胺酸、天門冬胺酸以及穀胺酸結合，構成葡萄糖耐受性因子 (glucose tolerance factor; GTF)，進而促進胰島素作用，使細胞有效吸收葡萄糖代謝使用以及儲存，進而維持血液中葡萄糖穩定與平衡 (McCarty, 1980)；然而不正常高濃度鉻在細胞中會產生大量高濃度反應性氧化產物以及反應性中間產物，而此這些物質會透過氧化壓力或直接與間接作用破壞正常細胞調控 (O'Brien et al, 2003)。儘管鉻對體內平衡的調控與細胞調控的影響逐漸被清楚探討與了解，但是鉻在肺癌發展過程中確實的致癌機轉目前仍未被清楚的釐清。

四、鎳與鉻暴露之相關性研究

環境採樣分析顯示，相較於工作環境與職業相關高濃度鎳暴露之外，工廠排放以

及日常生活中含鎳產品的使用皆會增加非職業性鎳的暴露 (Kasprzak et al, 2003)。另一方面，空氣中懸浮微粒表面大量鉻、鎳、鐵、鋅、錳、鈷等金屬元素吸附也可能透過呼吸作用進入人體肺臟之中 (Fang et al, 2006)，而這也暗示著隨著環境懸浮微粒增加，鎳與鉻透過呼吸系統進入人體的機會也會隨之增加。此外，環境流行病學分析結果顯示，居民尿液中鎳含量與居住地區距離鎳精煉廠之遠近具有高度正相關性 (Smith-Sivertsen et al, 1998)。無獨有偶，在台灣的環境分析研究結果亦發現，居住於彰化地區電鍍廠密集區附近居民相較於居住於電鍍廠密度較低之地區居民，尿液中具有較高鎳含量 (Chang et al, 2006a)。另一方面，台灣彰化地區居民血液中鉻含量與居民居住環境電鍍廠密度呈現高度正相關 (Chang et al, 2006b)。除此之外，相較於非肺癌患者，肺癌患者肺臟組織具有較高鎳與鉻的累積，儘管菸草已經被證實含有高濃度重金屬含量，但此現象並不能全然解釋肺癌患者肺臟組織鎳與鉻含量與肺癌的相關性 (De Palma et al, 2008; Kuo et al, 2006)。因此，這似乎暗示著除了工作環境高濃度重金屬暴露以及菸草中高濃度重金屬伴隨抽菸行為進入肺臟中可能導致鎳與鉻進入肺臟，促進肺癌發生之外，長期環境低濃度鎳與鉻暴露所貢獻之重金屬含量可能也是促進肺癌發生的一個重要因素；儘管如此，鎳與鉻如何影響正常細胞調控與貢獻於肺癌發生目前仍未完全清楚辨析。

五、p53 抑癌基因與癌症相關性研究

p53 基因為一抑癌基因，位於染色體 17p13.1 的位置，具有 11 個 exons，能轉譯出 393 個胺基酸，即 53kDa 的核蛋白。p53 蛋白可分為四部分：(1) N 端，具活化基因轉錄功能 (1-42 個胺基酸)，(2) 中心區域，能與 DNA 結合 (120-290 個胺基酸)，(3) C 端，含有 p53 進入細胞核的訊息 (nuclear localization signal) 形成寡合體 (oligomerization) 的區域 (320-360 個胺基酸)，(4) p53 與 DNA 結合調節區域 (363-393 個胺基酸)(Ko & Prives, 1996)。p53 的調控與細胞周期控制、細胞凋亡以及誘發修補機制啟動有關 (Lavin & Gueven, 2006; Vogelstein et al, 2000)。當

DNA 受到傷害時，p53 基因會刺激其下游因子，如 p21、MDM2 和 Bcl-2 活化，促使細胞周期停滯，進行細胞修補；但是當細胞受到傷害過大或無法修補時，p53 變會活化 PUMA 或 BAX 等下游因子促使細胞凋亡 (Vogelstein et al, 2000; Vousden & Lane, 2007)。因此，在癌症發生過程中，p53 表現異常或發生突變對癌症具有一個決定性的關鍵角色。過去研究室研究結果發現 XPC 和 MGMT 修補基因啟動子發生過度甲基化程度與 p53 發生突變成正相關，而且進一步研究發現此正相關可能是導因於 XPC 和 MGMT 發生甲基化導致轉錄活性降低貢獻於 p53 發生突變之過程 (Lai et al, 2008; Wu et al, 2008; Wu et al, 2007a; Wu et al, 2007b)。令人驚訝的是，在細胞研究中可以觀察到鎳會透過促進細胞 MGMT 啟動子甲基化影響 MGMT 表現與修補能力 (Iwitzki et al, 1998; Ji et al, 2008)；同時，鎳也能抑制細胞對 BPDE 和 UV 的修補能力，但是此影響是否是藉由抑制除 MGMT 以外的修補因子仍須加以分析探討 (Hartwig et al, 1994; Hu et al, 2004b)。此外，小樣本的職業流行病學研究指出，具高濃度鎳職業暴露工作史之肺癌患者，p53 具有顯著的 G to T 突變情況發生 (Harty et al, 1996)。另一方面，定序分析高濃度鎳處理上皮細胞發現，上皮細胞 p53 基因具有 T to C 突變發生，但是此 p53 突變在動物模式中貢獻於癌症的發生仍未被清楚辨析 (Haugen et al, 1994; Maehle et al, 1992; Weghorst et al, 1994)。此外，在人類上皮細胞暴露於高濃度金屬鉻之實驗中發現，鉻會促使細胞產生大量高濃度反應性氧化產物刺激 p53 活化促使細胞凋亡 (Ye et al, 1999)。儘管鎳與鉻已經被歸類為已知人類致癌物質，而 p53 在癌症發生過程占了一個中心的角色，但是過去僅有小樣本職業流行病學統計分析鎳和鉻與 p53 突變之關係，而是否鎳與鉻會透過促進 p53 突變貢獻於肺癌發展過程中仍需更進一步研究確定。

六、EGFR 與癌症相關性研究

上皮細胞成長因子接受器 (epidermal growth factor receptor, EGFR)位於染色體 7p12.3-12.1，共有 28 個 exons，EGFR 是細胞膜上之穿模糖蛋白，為表皮生長因

子 (epidermal growth factor; EGF)之接受器，與上皮細胞癌之成長與惡化有關 (Gilmour et al, 2002)。EGFR 家族主要由 EGFR (erbB-1)、HER2/c-neu (erbB-2)、HER3 (erbB-3) 與 HER4 (erbB-4) 四個成員所構成 (Gilmour et al, 2002; Herbst et al, 2004; Schulze et al, 2005)，四種 EGFR 蛋白都具有胞外、細胞膜以及胞內功能區三部分，其中 ErbB-2 無內生性配位體，ErbB-3 則無 ATP 結合位置。當胞外功能區與配位體結合後，各 EGFR 家族蛋白會與本身或另外三者之一結合形成同合雙體或異合雙體，隨後透過磷酸化胞內功能區之酪胺酸 (tyrosine)活化下游 Ras-MAPK pathway、PI3K-Akt pathway、SAPK pathway 以及 STAT 等訊息傳遞路徑，進而促使細胞增生、存活、血管新生與細胞凋亡 (El-Rayes & LoRusso, 2004)。肺臟組織在 exon 18~21 較常發生突變，而 exon 19 與 exon 21 為主要發生突變之區域，其中 exon 19 大部分為缺失突變 (Tokumo et al, 2005)，exon 21 則以點突變為主 (Jackman et al, 2006)。台灣肺癌其 EGFR 也有極高之突變率，其中又以肺腺癌為主，約占 50% (Huang et al, 2004)；但是 EGFR 發生突變之原因仍未完全被釐清。

肆、材料與方法

一、檢體收集

1993 年至 2003 年間 184 位原發性肺癌患者 (International Classification of Disease, 9th rev; ICD code 162) 從台中榮民總醫院胸腔外科被收集。肺癌腫瘤組織從肺癌病患手術中切除；病例也由合格的病理專家執行一系列的病理檢查；腫瘤型態與部位根據世界衛生組織 (World Health Organization, 1981) 所決定。在本研究中，肺腺癌與鱗狀細胞癌各為 91 與 93 例。

二、重金屬分析

1. 樣本乾燥

本研究之乾燥方法是採用烘箱以高溫乾燥方式，將組織中所含之水分去除。研究進行前先以老鼠之肺臟組織先行試驗，找出乾燥樣品所需最佳時間；由數據顯示以烘箱在 103°C-105°C 加熱一小時後，可使樣本達到乾燥的程度，並且其重量達恆重。但是為了使乾燥之時間能適合所有之樣本以及確保達到完全乾燥的程度，因此將在烘箱中乾燥時間定為四小時。而實際之患者肺臟組織樣品當其由 -80°C 冰箱取出時，需先置於室溫下 30 分鐘，待其解凍後，隨後利用不鏽鋼器具剪取適當大小樣品置於蓋玻片上，再將樣本送至烘箱中以 103°C-105°C 烘乾四小時，再將樣本放置於乾燥箱中，在 24 小時內秤取乾重。

2. 樣本消化

本研究之消化過程及方法如 Fig. 1。首先將樣本與 2 ml (65%) HNO₃ 放入 20 ml 燒杯中，並蓋上表玻璃，加熱至近乾；待冷卻後，加入 1 ml (30%) H₂O₂ 並加熱至近乾。最後以 0.2% 硝酸溶液定量至 5 ml，放入冰箱保存待分析。

3. 石墨式原子吸收光譜儀 (graphite atomic absorption spectrometers; GAAS)之昇溫條件

為了使設定之昇溫條件可以直接適用於真實樣本，本研究在進行真實樣本測試之前，先以廠商建議之各金屬敏感性 (sensitivity) 測試濃度，進行昇溫條件測試，其方法如下：

(a) 最佳化乾燥步驟

固定乾燥溫度在 110°C 及 130°C，調整其 ramp time 及 hold time，在第二步驟之 hold time 結束前五秒以牙科鏡測試水汽之凝結，當觀察無水蒸氣凝結於鏡面時，即為最佳化乾燥時間；根據測試結果，鎳及鉻乾燥步驟，首先經由 1 秒 ramp time 將石墨爐昇溫至 110°C 並經由 30 秒 hold time 促使溶劑氣化，隨後再藉由 15 秒之 ramp time 將石墨爐昇溫至 130°C 並經由 30 秒 hold time 和緩地移除氣化後的溶劑。

(b) 最佳灰化條件

固定乾燥溫度及原子化溫度，分別以 100°C 為間隔，調整灰化溫度，測定其吸光值，在吸光值尚未下降前 (即待測樣品尚未漏失之前)，選用適合之溫度作為灰化溫度。若吸光值太低時，則以添加方式加入少量標準液；在本研究中鎳之最佳灰化條件為 1100°C、ramp time 為 10 秒、hold time 為 20 秒，鉻之最佳灰化條件為 1500°C、ramp time 為 10 秒、hold time 為 20 秒。

(c) 最佳原子化條件

固定乾燥溫度及灰化溫度，分別以 100°C 為間隔，調整原子化溫度，測定其吸光值，若吸光值太低時，則以添加方式加入少量標準液；鎳與鉻之最佳原子化條件皆為 2300°C、hold time 為 5 秒。

4. 添加基質修飾劑

組織樣本經消化後，仍存在一些基質會干擾分析，因此必須添加適當之基質修飾劑，以提高待測物原子化時的敏感度；根據儀器廠商之建議，在本研究鉻分析過程中，為了降低待測元素灰化時之揮發度、增加樣本基質灰化時之揮發度以及減少背景值，因此在鉻樣品中皆添加 $1 \mu\text{l } 5\text{mg Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

5. 品保與品管

本研究所進行之重金屬消化分析，其分析流程必須 Fig. 2.所示之實驗室品保品管流程，以確定分析數據之精確性與精準度。本研究之分析結果如下：

(a) 本研究於每批次樣品進行分析前，需先檢視儀器之狀況。首先進行儀器之敏感度測試，其吸光值須落在儀器廠商所建議之數值之 $\pm 20\%$ 以內才能進行分析工作，結果如 Table 1 所示，顯示儀器均處於最佳之狀況。

(b) 每批次樣本均重建一條檢量線，其檢量線之相關係數需大於 0.995 以上，並以另一廠牌之標準液，配製不同於原檢量線之濃度進行檢量線查核，其相對誤差需落在 10%以內。結果如 Table 1 所示，顯示每一種元素之檢量線查核均符合品保品管之要求。

(c) 每批次之實驗均進行實驗室全程空白值之分析，以確保消化以及分析過程沒有導入汙染；結果如 Table 2 所示。在鎳及鉻分析結果中，每批次之實驗全程空白值均低於水溶液中方法偵測極限之 3 倍。

(d) 每一批次樣品至少需製作一個標準品分析。

(e) 本研究於每批次之消化均測試各個元素之回收率 (recovery)，其值須落在 80~120%以內。各批次之回收率分析值如 Table. 3 所示，顯示本研究的強酸濕式消化過程中，重金屬濃度並無明顯漏失。

(f) 方法偵測極限 (method detection limit; MDL)

由於患者之肺臟組織取得不易，故先以 0.2%硝酸溶液進行方法偵測極限之測試。其測試方法如下：取適當體積之 0.2%硝酸溶液，依照消化步驟同時消化 7 個硝酸溶液樣本；求出各元素在 7 個樣本中之標準差，以其 3 倍標準差為本研究方法之生物樣本的方法偵測極限，結果如 Table. 4 所示；在本研究分析過程中，若樣本濃度低於方法偵測極限，則樣本濃度以一半方法偵測極限換算。

(g) 二重複分析

由於本實驗之樣品來源相當不易取得，並且每個樣品之重量均很小，因此沒有足夠的樣品進行二重複分析，故在本研究之中沒有進行二重複之分析。

三、肺臟組織 DNA 萃取與純化

取肺癌病患之肺臟組織 50-100 mg 置於含有 0.5 ml lysis buffer (10 mM Tris buffer pH 8.0、100 mM NaCl、0.5% SDS、25 mM EDTA，pH 8.0) 的 microtube 內，同時將組織塊剪碎，並加入 10 mg/ml 的 proteinase K 5 μ l，置於 56 °C 作用至少 16 小時，直到組織完全水解。再加入 0.5 ml phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1) 均勻混合後，以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液至新的 microtube 中，並重複上述步驟一次。再加入 0.5 ml chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 混合均勻，以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，將殘餘的 phenol 去除。取上清液加入約 1/10 倍體積的 3M NaOAc 與 2 倍體積的 100%酒精，混合均勻後，置於-20°C 下 30 分鐘以上，以幫助 DNA 沈澱。再以 12,000 rpm 離心 20 分鐘；最後去除上清液，加入 75%酒精洗去多餘的鹽類，去除上清液，真空乾燥直到近乾。將 DNA 溶於適量的滅菌水後利用紫外線光譜測定儀，測定組織 DNA 在 260 nm 和 280 nm 之吸光值，260nm / 280nm 吸光值之比值應在 1.6-1.8 之間為宜。若比值小於 1.6，表示其內所含的蛋白量過高，應再加入 proteinase K 處理後，重複 phenol /

chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1) 之後續步驟；若是比值大於 1.8，則表示 RNA 含量過高，同樣以 RNase 處理後重複上述步驟。DNA 的濃度計算方式以下列公式計算：DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $A_{260} \times 50 \times \text{稀釋倍數}$ 。將萃取之 DNA 置於 -20°C 冰箱中保存。

四、DNA 定序分析

1. 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)

(a) p53 基因

取 50 ng 的 DNA，加入 10X Taq buffer 5 μl (25 mM MgCl_2)、0.4 μl 的 25 mM dNTPs、各 1 μl 的 10 mM 的引子以及 0.2 μl 的 5 U/ml Taq DNA polymerase 後，以滅菌水補至 50 μl 並混合均勻，反應條件為： 94°C 、40 秒鐘； 58°C (exon 5,6) 或 63°C (exon 7,8)、40 秒鐘； 72°C 、40 秒鐘，上述條件反應進行 35 cycles 後，再 72°C 下延展 5 分鐘，Primer 序列如下：

p53 exon 5,6 :

Forward : 5'-GCCCTGACTTTCAACTCTGTCT-3'

Reverse : 5'-TTAACCCCTCCTCCCAGAGAC-3'

p53 exon 7,8 :

Forward : 5'-AGGCGCACTGGCCTCATCTT-3'

Reverse : 5'-CTCGCTTAGTGCTCCCTG-3'

(b) EGFR

EGFR 採用巢式聚合酶鏈鎖反應 (nested-PCR) 放大目標序列。取 50 ng 的 DNA，加入 10X Taq buffer 5 μl (25 mM MgCl_2)、0.4 μl 的 25 mM dNTPs、各 1 μl 的 10 mM 的引子以及 0.2 μl 的 5 U/ml Taq DNA polymerase 後，以滅菌水補至 50 μl 並混合均勻。反應條件為： 95°C 、20 秒鐘； 61°C 、30 秒鐘； 72°C 、1 分鐘，上述條件

反應進行 35 cycles 後，再以 72 °C 延展 5 分鐘，Primer 序列如下 (Lynch et al, 2004):

EGFR exon 19:

Forward : 5'-GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC-3'

Reverse : 5'-CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG-3'

EGFR exon 19 internal primer:

Forward : 5'-CCTTAGGTGCGGCTCCACAGC-3'

Reverse : 5'-CATTTAGGATGTGGAGATGAGC-3'

EGFR exon 21 :

Forward : 5'-CTAACGTTTCGCCAGCCATAAGTCC-3'

Reverse : 5'-GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG-3'

EGFR exon 21 internal primer:

Forward : 5'-CAGCCATAAGTCCTCGACGTGG-3'

Reverse : 5'-CATCCTCCCCTGCATGTGTAAAC-3'

2. PCR 產物純化

PCR 產物純化是使用純化試劑組 (Bio 101)所進行，步驟如下；將 PCR 產物加入 3 倍 PCR 產物體積的 NaI 及 5 µl 的 EZ-GLASSMILK Suspension (需先用震盪器將其充分混勻)，在室溫下作用 15 分鐘，每 5 分鐘緩和地上下搖晃。將 EZ-GLASSMILK 與 DNA 複合物，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘。去上清液後加入 500 µl 的 NEW WASH buffer，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，重複 3 次。最後去除上清液，並將樣本乾燥後，溶於 13 µl 的滅菌水。再將樣本以 12,000 rpm 離心 20 分鐘後，取上清液置於新的 microtube 中；最後，取 2 µl 產物以 agarose gel 電泳確認純化結果。

3. DNA 定序

取純化後的 DNA 2 μ l，加入 1 μ l 的 3.2 mM 的正股引子、5 X sequence buffer 1.5 μ l、1 μ l 的 Big Dye，並以滅菌水補至 10 μ l 混合均勻。反應條件為 96 $^{\circ}$ C、15 秒鐘；50 $^{\circ}$ C、10 秒鐘；60 $^{\circ}$ C、4 分鐘，上述條件反應進行 29 cycles。將反應後的產物進行 DNA 沉澱，先將 1.5 μ l 的 3 M NaOAc、32 μ l 的 100 % EtOH (先回溫以免影響定序結果) 及 6.5 μ l 的滅菌水混合均勻；將上述溶液與反應產物混合置於室溫 15 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 15 分鐘，去除上清液。加入 200 μ l 的 75 % EtOH 以洗去殘餘之鹽類，混合後以 13,000 rpm 離心 15 分鐘。離心並吸乾上清液後，將此產物溶於 10 μ l 的 Hi-Di Formamide (ABI, USA) 中，以 ABI 3100 自動定序儀定序。

五、MGMT 與 XPC 甲基化分析

MGMT 甲基化分析是根據 Palmisano 等人方法加以分析 (Herman et al, 1996; Palmisano et al, 2000; Wolf et al, 2001)。簡而言之，DNA 首先經由 PCR 放大 MGMT 序列，即 DNA 加入 10X Taq buffer 5 μ l (25 mM MgCl₂)、0.4 μ l 的 25 mM dNTPs、各 1 μ l 的 10 mM 的引子以及 0.2 μ l 的 5 U/ml Taq DNA polymerase 後，以滅菌水補至 50 μ l 並混合均勻，反應條件為：95 $^{\circ}$ C、30 秒鐘；52 $^{\circ}$ C、30 秒鐘；72 $^{\circ}$ C、30 秒鐘，上述條件反應進行 25 cycles 後，再 72 $^{\circ}$ C 下延展 10 分鐘；接著再以 bisulfate 處理 PCR 產物，最後再以 MGMT 甲基化與非甲基化兩組專用 primer 分析重複上述 PCR 放大步驟判別 MGMT 是否發生甲基化，而 Primer 序列如下：

MGMT gene :

MGMT Forward : (5'-GGATATGTTGGGATAGTT-3')

MGMT Reverse: (5'-CCAAAAACCCCAAACCC-3')

Unmethylated MGMT:

MGMT UM Forward : (5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3')

MGMT UM Reverse: (5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3')

Methylated MGMT:

MGMT M Forward: 5' _-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3'

MGMT M Reverse: 5 _-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3'

最後再透過 2%洋菜膠確認 MGMT 是否發生甲基化。XPC 甲基化分析則是先透過 PCR 經過反應條件為：94 °C、1 分鐘；54°C、1 分鐘；72 °C、1 分鐘，條件反應進行 35 cycles，再以 72 °C 延展 10 分鐘放大目標序列，接著再以 Hpa II 切割 PCR 產物，最後以 2%洋菜膠確認 XPC 是否發生甲基化；而 primer 如下：

XPC Forward: 5'-GCTTCCCGCAGTTTTTTTA-3'

XPC Reverse: 5'-GTTGCTTGTCTGGGCAAATTCCACT-3'

六、統計分析

本研究統計以 SAS 9.1 統計軟體進行分析。由於肺癌患者肺臟組織鎳及鉻濃度皆呈現非常態分布，因此在 p53 和 EGFR 突變與鎳及鉻濃度之差異是以 Wilcoxon rank sum test 加以分析。p53 與 EGFR 在各臨床因子與不同鎳及鉻濃度分組以及 MGMT 或 XPC 甲基化間突變頻率差異，則是由卡方檢定 (χ^2 -test)或 Fisher exact test 加以估算。並且利用邏輯式迴歸模式調整干擾因子之效應，評估鎳及鉻濃度與 p53 和 EGFR 發生突變之關係。

伍、結果與討論

本研究以斷代研究探討台灣肺癌患者之腫瘤周邊正常肺臟組織中鎳與鉻重金屬含量與 p53、EGFR 發生突變之相關性。本研究共收集了 184 位肺癌患者進行本研究，這些肺癌之臨床資料如 Table 5 所示。患者之平均年齡為 64.2 歲 (64.2 ± 10.0)、年齡分佈為 26-87 歲；女性有 62 人 (33.7%)，男性有 122 人 (66.3%)；不抽菸者有 110 人 (59.8%)，抽菸者有 74 人 (40.2%)；腺癌有 91 人 (49.5%)，鱗狀細胞癌有 93 人 (50.5%)；早期 (stage I and II) 有 95 人 (51.6%)，晚期 (stage III and IV) 有 89 人 (48.4%)。經由 Direct sequencing 分析結果顯示 p53 基因發生突變者有 70 人 (38.0%)，而 EGFR 基因突變者則有 35 人 (19.0%)。其中男性、抽菸者和鱗狀細胞癌患者相對於女性、非抽菸者和腺癌患者，具有較高之 p53 突變頻率 (44.3% vs. 25.8%, $P = 0.015$ for genders; 50% vs. 30%, $P = 0.006$ for smoking status; 49.5% vs. 26.4%, $P = 0.001$ for tumor type; Table 6)。而 p53 突變與患者年齡、腫瘤分期、腫瘤大小以及淋巴結轉移等都沒有統計上之差異 (Table 6)。過去研究指出，台灣肺癌之 p53 發生突變機率为 18-37% (Wang et al, 1998; Wu et al, 2007b)，尤其鱗狀細胞癌發生 p53 突變之頻率高達 55.9%。在本研究中儘管研究族群之 p53 發生突變率與過去研究相似，而鱗狀細胞癌之 p53 突變頻率卻有偏高之現象 (65.7%)。選樣的偏差可能會影響本研究之結果，為了減少選樣偏差的影響，進一步大樣本隨機取樣是必要的。另一方面，女性、不抽菸、腺癌 ($P < 0.001$ for genders; 5.4% vs. 28.2%, $P < 0.001$ for smoking status; 34.1% vs. 4.3%, $P < 0.001$ for tumor type; Table 6)。過去文獻指出，華人地區女性具有較高之肺腺癌罹患率 (Tokumo et al, 2005)，而在本研究之中，儘管研究族群之 EGFR 突變率僅有 19%，但是不抽菸女性腺癌患者 EGFR 突變率則高達 42.9%，此結果與華人地區肺癌患者之研究結果相似，儘管華人女性肺腺癌患者之 EGFR 突變率如此之高，但是造成不抽菸女性腺癌之 EGFR 發生突

變之致病因子至今仍然不清楚。

肺癌患者之正常肺臟組織鎳與鉻分別為 4.04 (標準誤：0.92) $\mu\text{g/g}$ 乾重以及 6.15 (標準誤：1.43) $\mu\text{g/g}$ 乾重。為了分析肺癌患者之正常肺臟組織重金屬濃度與 p53 和 EGFR 突變間之相關性，本研究進一步將鎳與鉻含量依其中位數區分為高、低兩組，即鎳含量高於中位值 0.47 $\mu\text{g/g}$ 乾重為鎳高含量組，低於 0.47 $\mu\text{g/g}$ 乾重者為低含量組；同樣的鉻之中位含量為 2 $\mu\text{g/g}$ 乾重，也將肺癌區分為鉻高、低兩組。結果發現肺癌患者肺組織具有高含量鎳之患者，發生 p53 突變率顯著高於低含量之肺癌患者 (54.3% vs. 25.2%, $P < 0.001$; Table 6)。鉻含量較高者相較較低者亦具有較高之 p53 突變的趨勢 (42.9% vs. 33.3%, $P = 0.183$)。但是肺癌患者肺組織中之鎳與鉻含量和 EGFR 突變並沒有統計上之相關性。為了進一步瞭解肺癌患者 p53 發生突變是否確實和鎳或鉻之環境暴露有關，本研究以邏輯式迴歸分析調整了性別、抽菸習慣與腫瘤形式等干擾因子，結果發現有較高鎳含量之患者的 p53 發生突變之危險性是低含量患者之 3.21 倍 (95% CI = 1.65-6.24; $P = 0.001$; Table 7)。但是高和低鉻含量患者的 p53 發生突變之危險性，並沒有統計上之差異 ($P = 0.536$)。同樣以多變項邏輯式迴歸模式調整性別、抽菸習慣以及腫瘤期別之後，高鎳含量之患者發生 EGFR 突變之危險性是低含量者之 2.13 倍，但沒有達到統計上之差異 (95% CI = 0.88-5.17, $P = 0.094$; Table 8)。而鉻含量則與 EGFR 突變沒有相關性 ($P = 0.644$)。除此之外，男性肺組織相較於女性具有較低的 EGFR 基因突變之危險 (OR = 0.22, 95% CI = 0.08-0.62, $P = 0.004$)，抽菸者發生 EGFR 基因突變的危險也較未抽菸患者為低 (OR = 0.28, 95% CI = 0.07-1.03, $P = 0.056$)；而晚期肺組織發生 EGFR 基因突變的危險也較早期肺組織為低 (OR = 0.33, 95% CI = 0.14-0.79, $P = 0.012$)。這些結果都顯示 EGFR 基因突變主要發生於不抽菸之女性肺腺癌組織，這結果與過去之研究結果一致。

抽菸是導致 p53 發生突變的主要因子 (Greenblatt et al, 1994)，長期抽菸會促進體

內香煙代謝產物 benzo[a]pyrene diol epoxides (BPDE) 與反應性氧化產物之累積，增加 p53 發生突變之機會 (Yu et al, 2002)，同時菸草中具有高濃度重金屬可能會隨著抽菸行為進入肺中。在細胞實驗發現鎳會透過抑制修補能力增加 BPDE 促進突變發生 (Hu et al, 2004b)。鉻本身致突變之潛力不強，但是鉻會促進 BPDE 鍵結至 p53 譯碼子 245、248 及 249 等位置 (Feng et al, 2003)，因此鉻可能藉由抑制核苷酸切除修補基因 (nucleotide excision repair; NER) 之表現而增加 p53 發生突變之頻率 (Cheng et al, 2000; Hu et al, 2004a)。EGFR 發生突變者大多為女性、不抽菸與腺癌患者，很少發生於男性、抽菸和鱗狀細胞癌患者 (Table 6)。為了釐清性別與抽菸對鎳與鉻累積於肺臟組織對 p53 和 EGFR 之影響，本研究將肺癌患者區分為不抽菸女性、不抽菸男性和抽菸男性三組，比較各組間 p53 和 EGFR 基因突變頻率和鎳與鉻之間的相關性，由於台灣女性肺癌患者中 90% 以上皆非抽菸者，本研究亦未收集到抽菸女性患者。由 Table 9 之結果顯示，高鎳含量之不抽菸者較低鎳含量之不抽菸者，有較高之 p53 突變率 (50% vs. 18.6%, $P = 0.005$)。而此現象無論在男性 (54.1% vs. 34.4%, $P = 0.029$) 與女性不抽菸者 (55% vs. 11.9%, $P < 0.001$) 都能觀察到。最令人驚訝的是，本研究發現有高鎳含量之不抽菸女性患者較低鎳含量者，有較高之 EGFR 突變率 (60% vs. 28.6%, $P = 0.018$; Table 9)。除此之外，我們同時觀察到有較高鉻含量之不抽菸患者較含量低者，有較高之 p53 突變率 ($P = 0.014$, Table 10)，而此現象主要是在不抽菸之男性患者觀察到 ($P = 0.011$)。過去研究發現香菸中含有鎳和鉻重金屬，因此抽菸會將此類重金屬吸入肺部，但是本研究不僅發現抽菸男性之鎳含量與 p53 發生突變有關，同時亦發現不抽菸女性之鎳暴露與 p53 和 EGFR 基因突變有正相關性。而在不抽菸男性之鉻暴露與 p53 發生有關。因此本研究在肺癌患者之結果似乎能印證細胞實驗之研究結果，鎳與鉻可能會透過抑制 DNA 修補能力，增加 p53 和 EGFR 突變頻率，而參與肺癌之形成，尤其是不抽菸之肺癌患者。本研究提出鎳重金屬暴露可能與 EGFR 基因突變發生有關，似乎能解釋一部分台灣不抽菸女性肺癌為何一直為癌症之第一號殺手。

陸、參考文獻

Adamson RH, Thorgeirsson UP, Snyderwine EG, Thorgeirsson SS, Reeves J, Dalgard DW, Takayama S, Sugimura T (1990) Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques. *Jpn J Cancer Res* 81(1): 10-14.

Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vahakangas KH, Castren K, Welsh JA, Bowman ED, Khan MA, Flieder DB, Harris CC (1999) Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst* 91(23): 2009-2014.

Boffetta P (2006) Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res* 608(2): 157-162.

Chang FH, Wang HJ, Wang SL, Wang YC, Hsieh DP, Chang LW, Ko YC (2006a) Survey of urinary nickel in residents of areas with a high density of electroplating factories. *Chemosphere* 65(10): 1723-1730.

Chang FH, Wang SL, Huang YL, Tsai MH, Yu ST, Chang LW (2006b) Biomonitoring of chromium for residents of areas with a high density of electroplating factories. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 16(2): 138-146.

Chen SC, Wong RH, Shiu LJ, Chiou MC, Lee H (2008) Exposure to mosquito coil smoke may be a risk factor for lung cancer in Taiwan. *J Epidemiol* 18(1): 19-25.

Cheng L, Spitz MR, Hong WK, Wei Q (2000) Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 21(8): 1527-1530.

Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H (2001) The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* 61(7): 2799-2803.

Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, Chen CY, Lee H (2007) Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res* 67(22): 10686-10693.

Chiang TA, Wu PF, Ko YC (1999) Identification of carcinogens in cooking oil fumes. *Environ Res* 81(1): 18-22.

Chiang TA, Wu PF, Wang LF, Lee H, Lee CH, Ko YC (1997) Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbon content of fumes from heated cooking oils produced in Taiwan. *Mutat Res* 381(2): 157-161.

De Palma G, Goldoni M, Catalani S, Carbognani P, Poli D, Mozzoni P, Acampa O, Internullo E, Rusca M, Apostoli P (2008) Metallic elements in pulmonary biopsies from lung cancer and control subjects. *Acta Biomed* 79 Suppl 1: 43-51.

Doll R (1958) Cancer of the lung and nose in nickel workers. *Br J Ind Med* 15(4): 217-223.

El-Rayes BF, LoRusso PM (2004) Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 91(3): 418-424.

Fang GC, Wu YS, Lin JB, Lin CK, Rau JY, Huang SH (2006) Characterization of atmospheric particulate and metallic elements at Taichung Harbor near Taiwan Strait during 2004-2005. *Chemosphere* 63(11): 1912-1923.

Felton JS, Knize MG, Shen NH, Andresen BD, Bjeldanes LF, Hatch FT (1986)

Identification of the mutagens in cooked beef. *Environ Health Perspect* 67: 17-24.

Feng Z, Hu W, Rom WN, Costa M, Tang MS (2003) Chromium(VI) exposure enhances polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA binding at the p53 gene in human lung cells. *Carcinogenesis* 24(4): 771-778.

Gilmour LM, Macleod KG, McCaig A, Sewell JM, Gullick WJ, Smyth JF, Langdon SP (2002) Neuregulin expression, function, and signaling in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 8(12): 3933-3942.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54(18): 4855-4878.

Grimsrud TK, Berge SR, Haldorsen T, Andersen A (2005) Can lung cancer risk among nickel refinery workers be explained by occupational exposures other than nickel? *Epidemiology* 16(2): 146-154.

Hartwig A, Mullenders LH, Schlepegrell R, Kasten U, Beyersmann D (1994) Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cancer Res* 54(15): 4045-4051.

Harty LC, Guinee DG, Jr., Travis WD, Bennett WP, Jett J, Colby TV, Tazelaar H, Trastek V, Pairolero P, Liotta LA, Harris CC, Caporaso NE (1996) p53 mutations and occupational exposures in a surgical series of lung cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5(12): 997-1003.

Haugen A, Maehle L, Mollerup S, Rivedal E, Ryberg D (1994) Nickel-induced alterations in human renal epithelial cells. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3:

117-118.

Herbst RS, Fukuoka M, Baselga J (2004) Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer* 4(12): 956-965.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9821-9826.

Hu W, Feng Z, Tang MS (2004a) Chromium(VI) enhances (+/-)-anti-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro benzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells through its inhibitory effect on nucleotide excision repair. *Biochemistry* 43(44): 14282-14289.

Hu W, Feng Z, Tang MS (2004b) Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25(3): 455-462.

Huang SF, Liu HP, Li LH, Ku YC, Fu YN, Tsai HY, Chen YT, Lin YF, Chang WC, Kuo HP, Wu YC, Chen YR, Tsai SF (2004) High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 10(24): 8195-8203.

Huang X, Zhuang Z, Frenkel K, Klein CB, Costa M (1994) The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3: 281-284.

Iwitzki F, Schlepegrell R, Eichhorn U, Kaina B, Beyersmann D, Hartwig A (1998)

Nickel(II) inhibits the repair of O6-methylguanine in mammalian cells. *Arch Toxicol* 72(11): 681-689.

Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, Bell DW, Huberman MS, Halmos B, Rabin MS, Haber DA, Lynch TJ, Meyerson M, Johnson BE, Janne PA (2006) Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 12(13): 3908-3914.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60(5): 277-300.

Ji W, Yang L, Yu L, Yuan J, Hu D, Zhang W, Yang J, Pang Y, Li W, Lu J, Fu J, Chen J, Lin Z, Chen W, Zhuang Z (2008) Epigenetic silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene in NiS-transformed cells. *Carcinogenesis* 29(6): 1267-1275.

Kasprzak KS, Sunderman FW, Jr., Salnikow K (2003) Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* 533(1-2): 67-97.

Ke Q, Davidson T, Chen H, Kluz T, Costa M (2006) Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride. *Carcinogenesis* 27(7): 1481-1488.

Ko LJ, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10(9): 1054-1072.

Ko YC, Lee CH, Chen MJ, Huang CC, Chang WY, Lin HJ, Wang HZ, Chang PY (1997) Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan. *Int J Epidemiol* 26(1): 24-31.

Koo LC, Ho JH (1990) Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in

nonsmokers. *Int J Epidemiol* 19 Suppl 1: S14-23.

Kuo CY, Wong RH, Lin JY, Lai JC, Lee H (2006) Accumulation of chromium and nickel metals in lung tumors from lung cancer patients in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A* 69(14): 1337-1344.

Lai JC, Cheng YW, Goan YG, Chang JT, Wu TC, Chen CY, Lee H (2008) Promoter methylation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase in lung cancer is regulated by p53. *DNA Repair (Amst)* 7(8): 1352-1363.

Lavin MF, Gueven N (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13(6): 941-950.

Lee CH, Ko YC, Goggins W, Huang JJ, Huang MS, Kao EL, Wang HZ (2000) Lifetime environmental exposure to tobacco smoke and primary lung cancer of non-smoking Taiwanese women. *Int J Epidemiol* 29(2): 224-231.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350(21): 2129-2139.

Maehle L, Metcalf RA, Ryberg D, Bennett WP, Harris CC, Haugen A (1992) Altered p53 gene structure and expression in human epithelial cells after exposure to nickel. *Cancer Res* 52(1): 218-221.

Matos EL, Vilensky M, Mirabelli D, Boffetta P (2000) Occupational exposures and lung cancer in Buenos Aires, Argentina. *J Occup Environ Med* 42(6): 653-659.

Mattagajasingh SN, Misra HP (1999) Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium(VI) in cultured intact human cells. *Mol Cell Biochem* 199(1-2): 149-162.

McCarty MF (1980) The therapeutic potential of glucose tolerance factor. *Med Hypotheses* 6(11): 1177-1189.

O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 533(1-2): 3-36.

Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T (1991) Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. *Mutat Res* 259(3-4): 399-410.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA (2000) Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 60(21): 5954-5958.

Schulze WX, Deng L, Mann M (2005) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1: 2005 0008.

Smith-Sivertsen T, Tchachtchine V, Lund E, Bykov V, Thomassen Y, Norseth T (1998) Urinary nickel excretion in populations living in the proximity of two russian nickel refineries: a Norwegian-Russian population-based study. *Environ Health Perspect* 106(8): 503-511.

Sugimura T, Nagao M, Wakabayashi K (1996) Carcinogenicity of food mutagens. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3: 429-433.

Sugimura T, Sato S (1983) Bacterial mutagenicity of natural materials, pyrolysis products and additives in foodstuffs and their association with genotoxic effects in

mammals. *Dev Toxicol Environ Sci* 11: 115-133.

Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Ueda R (1992) p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking. *Cancer Res* 52(3): 734-736.

Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, Ichimura K, Tsuda T, Yano M, Tsukuda K, Tabata M, Ueoka H, Tanimoto M, Date H, Gazdar AF, Shimizu N (2005) The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 11(3): 1167-1173.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810): 307-310.

Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4): 275-283.

Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, Lee H (1998) High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cell lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res* 58(2): 328-333.

Weghorst CM, Dragnev KH, Buzard GS, Thorne KL, Vandeborne GF, Vincent KA, Rice JM (1994) Low incidence of point mutations detected in the p53 tumor suppressor gene from chemically induced rat renal mesenchymal tumors. *Cancer Res* 54(1): 215-219.

Wolf P, Hu YC, Doffek K, Sidransky D, Ahrendt SA (2001)

O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the

p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61(22): 8113-8117.

Wozniak K, Blasiak J (2002) Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride. *Mutat Res* 514(1-2): 233-243.

Wu JY, Wang J, Lai JC, Cheng YW, Yeh KT, Wu TC, Chen CY, Lee H (2008) Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann Surg Oncol* 15(11): 3272-3277.

Wu YH, Cheng YW, Chang JT, Wu TC, Chen CY, Lee H (2007a) Reduced XPC messenger RNA level may predict a poor outcome of patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 110(1): 215-223.

Wu YH, Tsai Chang JH, Cheng YW, Wu TC, Chen CY, Lee H (2007b) Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *Oncogene* 26(33): 4761-4773.

Yan Y, Kluz T, Zhang P, Chen HB, Costa M (2003) Analysis of specific lysine histone H3 and H4 acetylation and methylation status in clones of cells with a gene silenced by nickel exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 190(3): 272-277.

Ye J, Wang S, Leonard SS, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Castranova V, Shi X (1999) Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274(49): 34974-34980.

Yu D, Berlin JA, Penning TM, Field J (2002) Reactive oxygen species generated by

PAH o-quinones cause change-in-function mutations in p53. *Chem Res Toxicol* 15(6): 832-842.

Zoroddu MA, Schinocca L, Kowalik-Jankowska T, Kozlowski H, Salnikow K, Costa M (2002) Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modeling Ni(II) binding site in histone H4. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5: 719-723

柒、圖與表

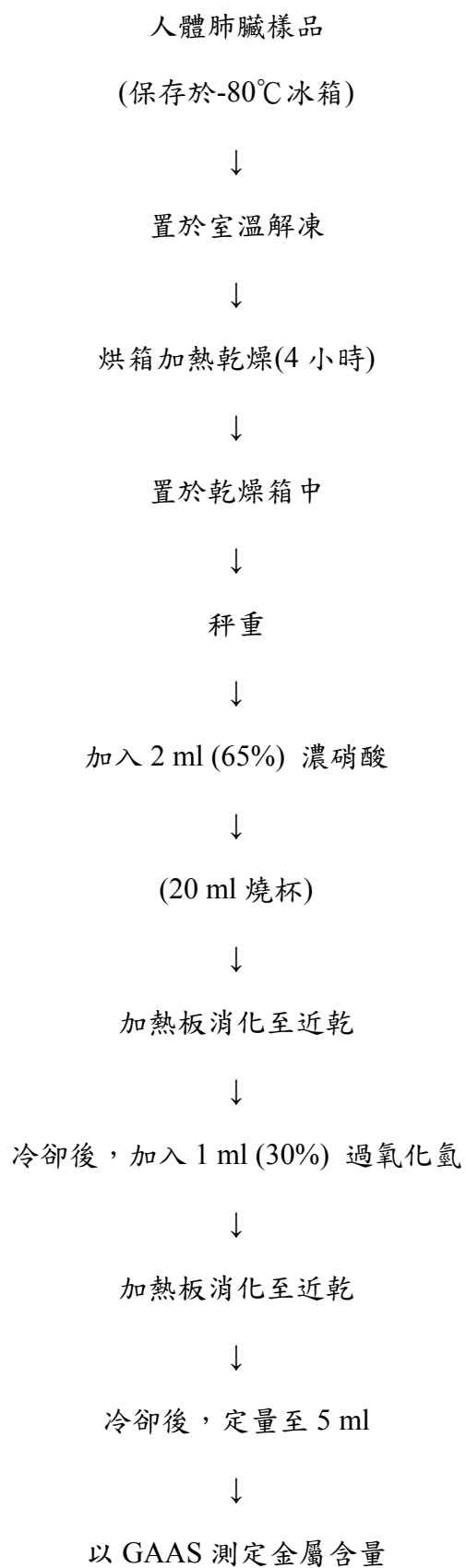
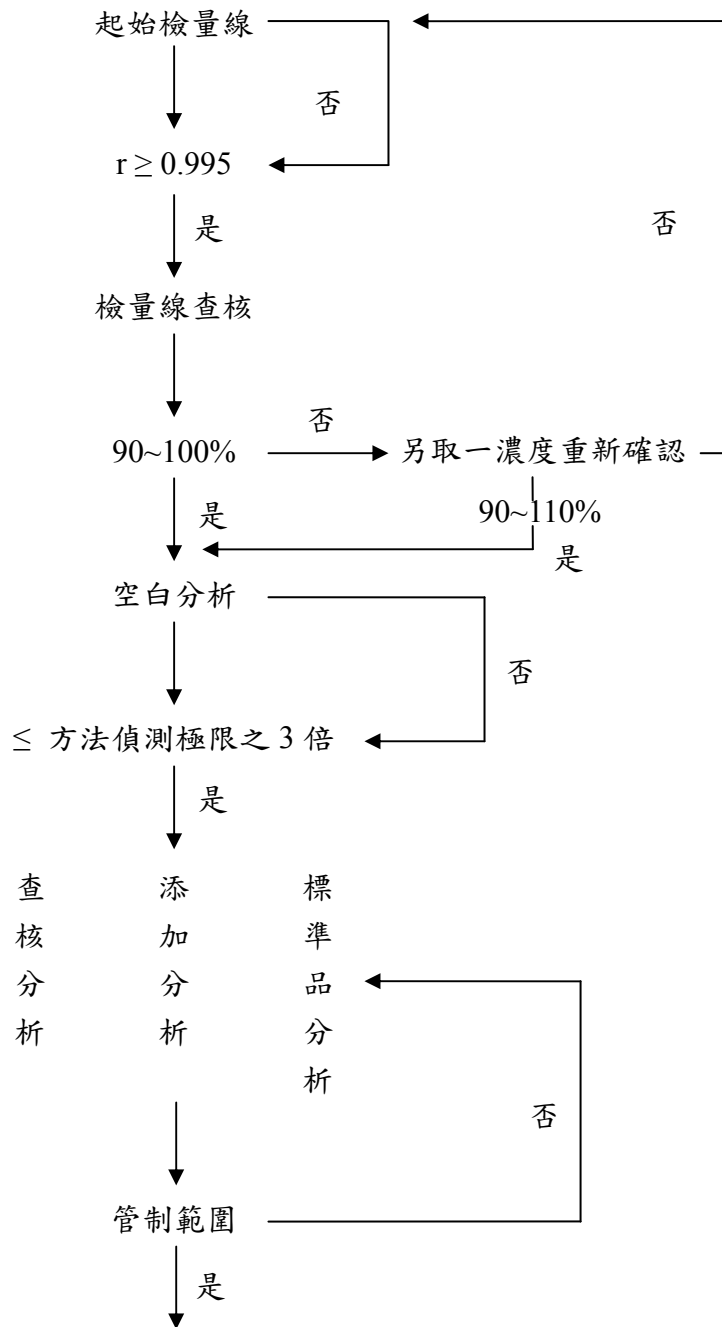


Fig. 1. Digestion for lung tissue.



登錄實驗記錄本，並計算精確性及精密性

Fig. 2. Flow chart of the QA/QC.

Table 1. The QA/QC data of calibration in nickel and chromium.

| Metal | Sensitivity test | | | r | | Calibration test | |
|----------|------------------|-------------------|-----------------|---------------------|--------|------------------|-------------------|
| | n | Mean ^a | Certified value | RSD(%) ^b | Mean | Range | Mean (%) \pm SD |
| Nickel | 4 | 0.24 | 0.22 | 0.74 \pm 0.39 | 0.9986 | 0.9985-0.9993 | 112.78 \pm 4.46 |
| Chromium | 6 | 0.18 | 0.16 | 1.16 \pm 0.43 | 0.9963 | 0.9994-0.9999 | 104.78 \pm 1.83 |

^a. Values are in absorbance (abs.).

^b. Values are mean (%) \pm SD.

Table. 2. Background levels ($\mu\text{g/L}$) of nickel and chromium in blank solutions.

| Metal | n | Min | Max | Mean | SD |
|----------|----|-----|-------|-------|------|
| Nickel | 13 | 0 | 0.194 | -0.72 | 0.64 |
| Chromium | 14 | 0 | 1.495 | 0.37 | 0.40 |

The unit of the value is $\mu\text{g/L}$.

Table. 3. Recovery (%) for standard solution of nickel and chromium.

| Metal | N | Min | Max | Mean | SD |
|----------|----|--------|--------|--------|-------|
| Nickel | 14 | 83.5% | 116.7% | 105.9% | 10.3% |
| Chromium | 13 | 102.1% | 120.1% | 113.3% | 5.4% |

Table. 4. The method detection limits (MDL) of nickel and chromium.

| Metal | n | Min | Max | Mean | SD | MDL |
|----------|---|-------|-------|-------|------|------|
| Nickel | 7 | -1.02 | -0.53 | -0.76 | 0.02 | 0.07 |
| chromium | 7 | 0.51 | 1.57 | 0.98 | 0.39 | 1.17 |

The unit of the value is $\mu\text{g/L}$.

Table 5. Demographic characteristics of the study population.

| Characteristic | Frequency | Percentage (%) |
|------------------|-----------------|----------------|
| No. of subjects | 184 | |
| Age distribution | | |
| Mean \pm SD | 64.2 \pm 10.0 | |
| Range | 26-87 | |
| Gender | | |
| Female | 62 | 33.7 |
| Male | 122 | 66.3 |
| Smoking status | | |
| Non-smokers | 110 | 59.8 |
| Smokers | 74 | 40.2 |
| Tumor type | | |
| ADC | 91 | 49.5 |
| SCC | 93 | 50.5 |
| Tumor stage | | |
| I and II | 95 | 51.6 |
| III and IV | 89 | 48.4 |
| T value | | |
| T1 and T2 | 136 | 73.9 |
| T3 and T4 | 48 | 26.1 |
| N value | | |
| No | 85 | 46.2 |
| N1, N2, and N3 | 99 | 53.8 |

Table 6. Relationships of p53 and EGFR mutations with clinical features in lung cancer patients.

| Variables | p53 mutation | | P ^a | EGFR mutation | | P ^a |
|------------------|--------------|-------------|----------------|---------------|-------------|----------------|
| | Wild-type | Mutation | | Wild-type | Mutation | |
| No. subjects | 114 | 70 | | 149 | 35 | |
| Age distribution | 63.5 ± 10.4 | 65.4 ± 9.3 | 0.201 | 64.6 ± 9.7 | 62.5 ± 11.1 | 0.252 |
| Age | | | | | | |
| ≤ 66 years | 63 (66.3) | 32 (33.7) | 0.208 | 75 (78.9) | 20 (21.1) | 0.468 |
| > 66 years | 51 (57.3) | 38 (42.7) | | 74 (83.1) | 15 (16.9) | |
| Gender | | | | | | |
| Female | 46 (74.2) | 16 (25.8) | 0.015 | 38 (61.3) | 24 (38.7) | < 0.001 |
| Male | 68 (55.7) | 54 (44.3) | | 111 (91.0) | 11 (9.0) | |
| Smoking habit | | | | | | |
| Non-smokers | 77 (70.0) | 33 (30.0) | 0.006 | 79 (71.8) | 31 (28.2) | < 0.001 |
| Smokers | 37 (50.0) | 37 (50.0) | | 70 (94.6) | 4 (5.4) | |
| Tumor type | | | | | | |
| ADC | 67 (73.6) | 24 (26.4) | 0.001 | 60 (65.9) | 31 (34.1) | < 0.001 |
| SCC | 47 (50.5) | 46 (49.5) | | 89 (95.7) | 4 (4.3) | |
| Tumor stage | | | | | | |
| I / II | 60 (63.2) | 35 (36.8) | 0.729 | 71 (74.7) | 24 (25.3) | 0.026 |
| III/IV | 54 (60.7) | 35 (39.3) | | 78 (87.6) | 11 (12.4) | |
| T value | | | | | | |
| T1 and T2 | 86 (63.2) | 50 (36.8) | 0.548 | 106 (77.9) | 30 (22.1) | 0.077 |
| T3 and T4 | 28 (58.3) | 20 (41.4) | | 43 (95.6) | 5 (4.4) | |
| N value | | | | | | |
| N0 | 54 (63.5) | 31 (36.5) | 0.684 | 69 (81.2) | 16 (18.8) | 0.949 |
| N1,N2 and N3 | 60 (60.6) | 39 (39.4) | | 80 (80.8) | 19 (19.2) | |
| Ni accumulation | 1.7 ± 4.5 | 7.8 ± 18.8 | < 0.001 | 3.7 ± 11.6 | 5.5 ± 15.8 | 0.733 |
| Ni ^b | | | | | | |
| Low | 77 (74.8) | 26 (25.2) | < 0.001 | 85 (82.5) | 18 (17.5) | 0.547 |
| High | 37 (45.7) | 44 (54.3) | | 64 (79.0) | 17 (21.0) | |
| Cr accumulation | 3.5 ± 5.7 | 10.5 ± 30.4 | 0.012 | 6.6 ± 21.5 | 4.3 ± 5.0 | 0.114 |
| Cr ^b | | | | | | |
| Low | 62 (66.7) | 31 (33.3) | 0.183 | 77 (82.8) | 16 (17.2) | 0.525 |
| High | 52 (57.1) | 39 (42.9) | | 72 (79.1) | 19 (20.9) | |

^a P < 0.05, compared with the wild-type p53 or EGFR group was calculated by χ^2 test, t-test or Wilcoxon rank sum test.

^b The cutoff value for high or low level of nickel and chromium is the median content (nickel: 0.47 ug/dry weight; chromium: 2 ug/dry weight)

Table 7. Association of various potential factors with p53 mutations in lung cancer patients.

| Variable | Category | AOR | 95% CI | P ^b |
|-----------------------|-----------------------|------|-----------|----------------|
| Gender | Male / Female | 1.18 | 0.48-2.90 | 0.726 |
| Smoking status | Smokers / Non-smokers | 1.35 | 0.60-3.02 | 0.472 |
| Tumor type | SCC / ADC | 2.30 | 1.11-4.74 | 0.025 |
| Nickel ^a | High / Low | 3.21 | 1.65-6.24 | 0.001 |
| Chromium ^a | High / Low | 1.23 | 0.63-2.40 | 0.536 |

^a The cutoff value for high or low level of nickel and chromium is the median content (nickel: 0.47 ug/dry weight; chromium: 2 ug/dry weight).

^b P < 0.05, compared with the wild-type p53 group was calculated by logistic regression

Table 8. Association of various potential variables with EGFR mutations in lung cancer patients.

| Variable | Category | AOR | 95% CI | P ^b |
|-----------------------|-----------------------|------|-----------|----------------|
| Gender | Male / Female | 0.22 | 0.08-0.62 | 0.004 |
| Smoking status | Smokers / Non-smokers | 0.28 | 0.07-1.03 | 0.056 |
| Tumor stage | III, IV / I , II | 0.33 | 0.14-0.79 | 0.012 |
| Nickel ^a | High / Low | 2.13 | 0.88-5.17 | 0.094 |
| Chromium ^a | High / Low | 0.82 | 0.35-1.93 | 0.644 |

^a. The cutoff value for high or low level of nickel and chromium is the median content (nickel: 0.47 ug/dry weight; chromium: 2 ug/dry weight)

^b. P < 0.05, compared with the wild-type EGFR group was calculated by logistic regression

Table 9. Association of p53 and EGFR mutations with nickel contents in lung cancer patients stratified by smoking status and genders.

| Nickel content | p53 mutation | | P ^a | EGFR mutation | | P ^a |
|--------------------------|--------------|-----------|----------------|---------------|-----------|----------------|
| | Wild-type | Mutation | | Wild-type | Mutation | |
| Non-smokers ^b | | | | | | |
| Low | 57 (81.4) | 13 (18.6) | 0.005 | 53 (75.7) | 17 (24.3) | 0.230 |
| High | 20 (50.0) | 20 (50.0) | | 26 (65.0) | 14 (35.0) | |
| Smokers | | | | | | |
| Low | 20 (60.6) | 13 (39.4) | 0.102 | 32 (97.0) | 1 (3.0) | 0.624 |
| High | 17 (41.5) | 24 (58.5) | | 38 (92.7) | 3 (7.3) | |
| Female | | | | | | |
| Low | 37 (88.1) | 5 (11.9) | < 0.001 | 30 (71.4) | 12 (28.6) | 0.018 |
| High | 9 (45.0) | 11 (55.0) | | 8 (40.0) | 12 (60.0) | |
| Male | | | | | | |
| Low | 40 (65.6) | 21 (34.4) | 0.029 | 55 (90.2) | 6 (9.8) | 0.752 |
| High | 28 (45.9) | 33 (54.1) | | 56 (91.8) | 5 (8.2) | |

^aP < 0.05, compared with the wild-type p53 or EGFR group was calculated by χ^2 test, t-test or Wilcoxon rank sum test.

^b The cutoff value for high or low level of nickel is the median content (nickel: 0.47 ug/dry weight)

Table 10. Association of p53 and EGFR mutations with chromium contents in lung cancer patients stratified by smoking status and genders.

| Chromium content | p53 mutation | | P ^a | EGFR mutation | | P ^a |
|--------------------------|--------------|-----------|----------------|---------------|-----------|----------------|
| | Wild-type | Mutation | | Wild-type | Mutation | |
| Non-smokers ^b | | | | | | |
| Low | 43 (81.1) | 10 (18.9) | 0.014 | 38 (71.7) | 15 (28.3) | 0.979 |
| High | 34 (59.6) | 23 (40.4) | | 41 (71.9) | 16 (28.1) | |
| Smokers | | | | | | |
| Low | 19 (45.0) | 21 (55.0) | 0.641 | 39 (86.7) | 1 (13.3) | 0.328 |
| High | 18 (52.9) | 16 (47.1) | | 31 (91.2) | 3 (8.8) | |
| Female | | | | | | |
| Low | 22 (81.5) | 5 (8.5) | 0.249 | 17 (63.0) | 10 (37.0) | 0.812 |
| High | 24 (68.6) | 11 (31.4) | | 21 (60.0) | 14 (40.0) | |
| Male | | | | | | |
| Low | 40 (60.6) | 26 (39.4) | 0.240 | 60 (90.9) | 6 (9.1) | 0.975 |
| High | 28 (50.0) | 28 (50.0) | | 51 (91.1) | 5 (8.9) | |
| Male non-smokers | | | | | | |
| Low | 21 (81.0) | 5 (19.0) | 0.011 | 21 (81.0) | 5 (19.0) | 0.429 |
| High | 10 (45.5) | 12 (54.5) | | 20 (90.9) | 2 (9.1) | |
| Male smokers | | | | | | |
| Low | 19 (47.5) | 21 (52.5) | 0.641 | 39 (97.5) | 1 (2.5) | 0.328 |
| High | 18 (52.9) | 16 (47.1) | | 31 (91.2) | 3 (8.8) | |

^aP < 0.05, compared with the wild-type p53 or EGFR group was calculated by χ^2 test, t-test or Wilcoxon rank sum test.

^b The cutoff value for high or low level of nickel is the median content (nickel: 0.47 ug/dry weight)

Table 11. The combined effects of nickel contents and MGMT and XPC promoter hypermethylation with p53 mutations in lung cancer patients.

| Variables | n | p53 mutation | | AOR | 95% CI | P ^a |
|--|----|--------------|-----------|-------------------|------------|----------------|
| | | Negative | Positive | | | |
| MGMT methylation/ Nickel ^c | | | | | | |
| Negative / Low | 50 | 41 (77.4) | 12 (22.6) | 1.00 ^b | | |
| Negative / High | 33 | 19 (57.6) | 14 (42.4) | 2.65 | 1.00-7.06 | 0.051 |
| Positive / Low | 43 | 29 (67.4) | 14 (32.6) | 1.53 | 0.60-3.93 | 0.379 |
| Positive / High | 36 | 10 (27.8) | 26 (72.2) | 7.21 | 2.61-19.89 | <0.001 |
| XPC methylation/ Nickel ^c | | | | | | |
| Negative / Low | 47 | 32 (68.1) | 15 (31.9) | 1.00 ^b | | |
| Negative / High | 32 | 17 (53.1) | 15 (46.9) | 2.06 | 0.78-5.41 | 0.143 |
| Positive / Low | 49 | 38 (77.6) | 11 (22.5) | 0.70 | 0.27-1.84 | 0.464 |
| Positive / High | 37 | 12 (32.4) | 25 (67.6) | 4.23 | 1.63-11.01 | 0.003 |

^a P < 0.05, compared with the wild-type p53 subgroup, was calculated by logistic regression and adjusted for gender, smoking status and tumor type.

^b Reference group.

^c The cutoff value for high or low level of nickel is the median content (nickel: 0.47 ug/dry weight).

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/09/13

| | |
|-----------|--|
| 國科會補助計畫 | 計畫名稱: 鉻與鎳暴露對台灣不抽菸肺癌形成之可能性研究 |
| | 計畫主持人: 李輝 |
| | 計畫編號: 97-2314-B-040-027-MY3 學門領域: 公共衛生及環境醫學 |
| 無研發成果推廣資料 | |

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

| 計畫主持人：李輝 | | 計畫編號：97-2314-B-040-027-MY3 | | | | 計畫名稱：鉻與鎳暴露對台灣不抽菸肺癌形成之可能性研究 | |
|----------|-------------|----------------------------|-----------------|------------|------|-------------------------------------|-----|
| 成果項目 | | 量化 | | | 單位 | 備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等） | |
| | | 實際已達成數（被接受或已發表） | 預期總達成數（含實際已達成數） | 本計畫實際貢獻百分比 | | | |
| 國內 | 論文著作 | 期刊論文 | 0 | 0 | 100% | 篇 | |
| | | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 研討會論文 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專書 | 0 | 0 | 100% | | |
| | 專利 | 申請中件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 已獲得件數 | 0 | 0 | 100% | | |
| | 技術移轉 | 件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 權利金 | 0 | 0 | 100% | 千元 | |
| | 參與計畫人力（本國籍） | 碩士生 | 0 | 0 | 100% | 人次 | |
| | | 博士生 | 0 | 2 | 100% | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | 2 | 100% | | |
| | | 專任助理 | 0 | 0 | 100% | | |
| 國外 | 論文著作 | 期刊論文 | 0 | 0 | 100% | 篇 | |
| | | 研究報告/技術報告 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 研討會論文 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專書 | 0 | 0 | 100% | | 章/本 |
| | 專利 | 申請中件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 已獲得件數 | 0 | 0 | 100% | | |
| | 技術移轉 | 件數 | 0 | 0 | 100% | 件 | |
| | | 權利金 | 0 | 0 | 100% | 千元 | |
| | 參與計畫人力（外國籍） | 碩士生 | 0 | 0 | 100% | 人次 | |
| | | 博士生 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 博士後研究員 | 0 | 0 | 100% | | |
| | | 專任助理 | 0 | 0 | 100% | | |

| | |
|--|----------|
| <p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p> | <p>無</p> |
|--|----------|

| | 成果項目 | 量化 | 名稱或內容性質簡述 |
|---|-----------------|----|-----------|
| 科 教 處 計 畫 加 填 項 目 | 測驗工具(含質性與量性) | 0 | |
| | 課程/模組 | 0 | |
| | 電腦及網路系統或工具 | 0 | |
| | 教材 | 0 | |
| | 舉辦之活動/競賽 | 0 | |
| | 研討會/工作坊 | 0 | |
| | 電子報、網站 | 0 | |
| | 計畫成果推廣之參與(閱聽)人數 | 0 | |

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究之成果主要提出鎳與鉻環境暴露可能會經由抑制 DNA 修補基因之表現，增加 p53 和 EGFR 基因的突變率，進而造成肺癌之發生。結果發現鎳暴露與女性肺癌患者 p53 發生突變有關，而鉻暴露則與不抽菸男性之 p53 突變有關。另外，來自抽菸之鎳污染亦與抽菸男性患者之 p53 突變有關。由以上結果似乎可用來解釋為何台灣肺癌患者之 p53 突變率，在抽菸和不抽菸之患者沒有差異之部分原因。已知 EGFR 突變經常發生於不抽菸、女性和腺癌患者，但其病因學並不清楚。本研究之結果顯示，鎳暴露和女性不抽菸患者之 EGFR 突變有正相關性。這項發現可能是首次提出女性不抽菸肺癌患者為何有高突變率之可能原因。總之，本計畫之研究成果指出鎳與鉻之環境暴露可能參與台灣不抽菸者之肺癌形成。因此減少肺癌之發生不僅需減少抽菸量，同時應減少鎳與鉻之環境污染。建議政府未來應制定管制鎳與鉻之使用量，以達到降低國人肺癌之發生率，尤其不抽菸者。