

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

抽菸、綠茶飲用與微型核糖核酸-29b對於DNA甲基轉移酶表現、
腫瘤抑制基因 (GSTM2與BIM) 甲基化以及肺癌發展之效應(第
2年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2314-B-040-004-MY2
執行期間：105年08月01日至106年07月31日
執行單位：中山醫學大學公共衛生學系(所)

計畫主持人：翁瑞宏
共同主持人：李宣信
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳雅君
大專生-兼任助理人員：邵宣文
大專生-兼任助理人員：蔣昀宸
博士班研究生-兼任助理人員：黃家禎

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 106 年 10 月 18 日

中文摘要：抽菸所導致的肺癌是世界各地的重要公共衛生議題。抽菸會促使腫瘤抑制基因過度甲基化，因而容易引起癌症的發展。另一方面，綠茶可能抑制DNA甲基轉移酶與腫瘤抑制基因的表現，進而降低癌症的發生；此外，DNA甲基轉移酶與腫瘤抑制基因本身的基因型亦可能影響其基因之表現。更進一步地，微型核糖核酸 (microRNA [miR])-29b之表現也可能對於DNA甲基轉移酶之表現有所影響。重要的是，包括GSTM2與BIM的腫瘤抑制基因亦可能透過DNA甲基轉移酶來構成其甲基化，並且因為綠茶飲用與成分、以及GSTM2與BIM的基因多形性而導致其表現程度變化，進而影響肺癌的發展與存活。因此，我們設計流行病學來探討與印證在不同的香菸與綠茶成分暴露狀態中，DNA甲基轉移酶、miR-29b、腫瘤抑制基因GSTM2與BIM分別之基因多形性、甲基化程度以及表現彼此間的關係，以及了解對於肺癌發生與預後之影響。總計，有251名病例與502名對照被納入本研究，人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜、實際烹煮情形、以及肺癌家族史是由問卷訪視所獲得；血液miR-29b與DNMT3B mRNA表現量是以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 來判定；DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、GSTM2、以及BIM是以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) 來進行判定。結果顯示，健康對照之抽菸者相較於無抽菸者具有顯著較低的miR-29b表現量。在調整干擾因子的效應後，相較於miR-29b高度表現/DNMT3B mRNA低度表現者，合併其他miR-29b與DNMT3B mRNA表現分組者具有3.36倍 (95% C. I. = 1.11-10.17) 的顯著肺癌發生危險性。此外，抽菸狀況也分別與血液miR-29b以及DNMT3B mRNA表現對於肺癌發生危險性具有顯著的交互作用，並且綠茶飲用與DNMT3B mRNA表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用。然而，綠茶飲用與miR-29b表現對於肺癌發生危險並沒有顯著的合併效應。抽菸、飲用綠茶、炒菜油煙暴露、肺癌家族史、DNMTs基因型、GSTM2基因型、以及BIM基因型與肺癌發生危險有顯著相關。然而，抽菸與飲用綠茶分別與DNMTs、GSTM2、BIM基因型對於肺癌具有顯著的交互作用關係。我們的結果建議著，抽菸可能減少miR-29b的表現；而具有miR-29b低度表現以及DNMT3B mRNA高度表現之抽菸者，以及DNMT3B mRNA高度表現的未飲用綠茶者是更容易具有肺癌的發生。DNMTs、GSTM2、以及BIM易感受基因型可能會增加肺癌的發生危險。

中文關鍵詞：抽菸、肺癌、腫瘤抑制基因、綠茶、DNA甲基轉移酶、微型核糖核酸-29b

英文摘要：Lung cancer caused by cigarette smoking is the important public health issue around the world. Smoking could promote hypermethylation of tumor suppressor genes, thereby easily leading to the development of cancer. On the other hand, green tea might inhibit expression of DNA methyltransferases and tumor suppressor genes, and further decrease the occurrence of lung cancer. In addition, genotypes of DNA methyltransferases and tumor suppressor genes are likely to affect their self expressions. Moreover, microRNA-29b expression might also have an

influence on the expression of DNA methyltransferases. Importantly, methylation of tumor suppressor genes, including GSTM2 and BIM, might also be formed through DNA methyltransferases; and expression of tumor suppressor genes could be altered by green tea drinking and its ingredients, as well as the genetic polymorphisms of GSTM2 and BIM, thereby affecting the development of lung cancer and survival. Therefore, we design epidemiological studies to investigate and confirm the relationships of DNA methyltransferases, microRNA-29b, individual genotypes, methylation and expression of tumor suppressor genes GSTM2 and BIM in the different status of cigarette exposure and green tea drinking; and to understand their influences on the occurrence and prognosis of lung cancer. A total of 251 lung cancer patients and 502 healthy controls were recruited to measure miR-29b and DNMT3B mRNA expressions in whole blood by real-time polymerase chain reaction in the present study. DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, GSTM2, and BIM were determined by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism. Questionnaires were administered to obtain the epidemiologic and clinical characteristics. Results revealed, among healthy controls, smokers had a significantly lower miR-29b expression than nonsmokers. After adjusting the effects of confounding factors, compared to the subjects with the combination of higher miR-29b expression/lower DNMT3B mR

英文關鍵詞：cigarette smoking, lung cancer, tumor suppressor gene, green tea, DNA methyltransferase, microRNA-29b.

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

抽菸、綠茶飲用與微型核糖核酸-29b 對於 DNA 甲基轉移酶表現、
腫瘤抑制基因 (GSTM2 與 BIM) 甲基化以及肺癌發展之效應

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2314-B-040-004-MY2

執行期間：104 年 08 月 01 日至 106 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 公共衛生學系

計畫主持人：翁瑞宏 教授

共同主持人：李宣信 教授

計畫參與人員：黃家禎、林玟君、黃馨誼、劉奕均、郭奕均、陳雅君、
涂怡君、邵宣文、蔣昀宸

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，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

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，_____ (請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送)

中 華 民 國 106 年 10 月 20 日

摘要

抽菸所導致的肺癌是世界各地的重要公共衛生議題。抽菸會促使腫瘤抑制基因過度甲基化，因而容易引起癌症的發展。另一方面，綠茶可能抑制 DNA 甲基轉移酶與腫瘤抑制基因的表現，進而降低癌症的發生；此外，DNA 甲基轉移酶與腫瘤抑制基因本身的基因型亦可能影響其基因之表現。更進一步地，微型核糖核酸 (microRNA [miR])-29b 之表現也可能對於 DNA 甲基轉移酶之表現有所影響。重要的是，包括 GSTM2 與 BIM 的腫瘤抑制基因亦可能透過 DNA 甲基轉移酶來構成其甲基化，並且因為綠茶飲用與成分、以及 GSTM2 與 BIM 的基因多形性而導致其表現程度變化，進而影響肺癌的發展與存活。因此，我們設計流行病學來探討與印證在不同的香菸與綠茶成分暴露狀態中，DNA 甲基轉移酶、miR-29b、腫瘤抑制基因 GSTM2 與 BIM 分別之基因多形性、甲基化程度以及表現彼此間的關係，以及了解對於肺癌發生與預後之影響。總計，有 251 名病例與 502 名對照被納入本研究，人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜、實際烹煮情形、以及肺癌家族史是由問卷訪視所獲得；血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量是以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction) 來判定；DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、GSTM2、以及 BIM 是以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) 來進行判定。結果顯示，健康對照之抽菸者相較於無抽菸者具有顯著較低的 miR-29b 表現量。在調整干擾因子的效應後，相較於 miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者，合併其他 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現分組者具有 3.36 倍 (95% C.I. = 1.11-10.17) 的顯著肺癌發生危險性。此外，抽菸狀況也分別與血液 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性具有顯著的交互作用，並且綠茶飲用與

DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用。然而，綠茶飲用與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險並沒有顯著的合併效應。抽菸、飲用綠茶、炒菜油煙暴露、肺癌家族史、DNMTs 基因型、GSTM2 基因型、以及 BIM 基因型與肺癌發生危險有顯著相關。然而，抽菸與飲用綠茶分別與 DNMTs、GSTM2、BIM 基因型對於肺癌具有顯著的交互作用關係。我們的結果建議著，抽菸可能減少 miR-29b 的表現；而具有 miR-29b 低度表現以及 DNMT3B mRNA 高度表現之抽菸者，以及 DNMT3B mRNA 高度表現的未飲用綠茶者是更容易具有肺癌的發生。DNMTs、GSTM2、以及 BIM 易感受基因型可能會增加肺癌的發生危險。

關鍵詞：抽菸、肺癌、腫瘤抑制基因、綠茶、DNA 甲基轉移酶、微型核糖核酸-29b。

Abstract

Lung cancer caused by cigarette smoking is the important public health issue around the world. Smoking could promote hypermethylation of tumor suppressor genes, thereby easily leading to the development of cancer. On the other hand, green tea might inhibit expression of DNA methyltransferases and tumor suppressor genes, and further decrease the occurrence of lung cancer. In addition, genotypes of DNA methyltransferases and tumor suppressor genes are likely to affect their self expressions. Moreover, microRNA-29b expression might also have an influence on the expression of DNA methyltransferases. Importantly, methylation of tumor suppressor genes, including GSTM2 and BIM, might also be formed through DNA methyltransferases; and expression of tumor suppressor genes could be altered by green tea drinking and its ingredients, as well as the genetic polymorphisms of GSTM2 and BIM, thereby affecting the development of lung cancer and survival. Therefore, we design epidemiological studies to investigate and confirm the relationships of DNA methyltransferases, microRNA-29b, individual genotypes, methylation and expression of tumor suppressor genes GSTM2 and BIM in the different status of cigarette exposure and green tea drinking; and to understand their influences on the occurrence and prognosis of lung cancer. A total of 251 lung cancer patients and 502 healthy controls were recruited to measure miR-29b and DNMT3B mRNA expressions in whole blood by real-time polymerase chain reaction in the present study. DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, GSTM2, and BIM were determined by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism. Questionnaires were administered to obtain the epidemiologic and clinical characteristics. Results revealed, among healthy controls, smokers had a significantly lower miR-29b expression than nonsmokers. After adjusting the effects of

confounding factors, compared to the subjects with the combination of higher miR-29b expression/lower DNMT3B mRNA expression, subjects with other combinations of miR-29b and DNMT3B mRNA expression had a 3.36-fold (95% C.I. = 1.11-10.17) increased risk for lung cancer development. Significant interactions of smoking with miR-29b or DNMT3B mRNA expression on lung cancer development were observed; respectively. Smoking, green tea consumption, exposure to fumes of cooking, family history of lung cancer, DNMTs genotype, GSTM2 genotype, and BIM genotype were significantly associated with development of lung cancer. However, the test for the interaction between smoking, green tea consumption and DNMTs, GSTM2 genotypes on lung cancer risk was significant. Our study suggested smoking might reduce the miR-29b expression. Smokers with lower miR-29b expression and higher DNMT3B mRNA expression, and green tea nondrinkers with higher DNMT3B mRNA expression were more susceptible for lung cancer development. DNMTs, GSTM2, BIM genotype with higher promoter activity might increase lung cancer risk elicited by smoking.

Keywords: cigarette smoking, lung cancer, tumor suppressor gene, green tea, DNA methyltransferase, microRNA-29b.

第一章 抽菸、綠茶飲用與 DNA 甲基轉移酶 3B (DNMT3B) 基因多形性對於肺癌發生之相關

前言

肺癌 (lung cancer) 與抽菸和環境二手菸之穩定相關已經被廣泛地建立，並且也預估戒菸可預防超過90%以上的肺癌 [1]。實際上，香煙是一種包含數千種化合物的複雜混合物，其中很多是已知或者是疑似人類致癌物 [2, 3]。香煙的焦油 (tar) 部分已經被顯示是苯醌 (quinone)/對苯二酚 (hydroquinone) 氧化還原反應的複雜混合物 [3-5]，具有催化產生過氧化陰離子的能力。氣態煙則包含穩定濃度的游離基，可導致氮氧化物對於在煙流中之低分子量碳氫化合物引動自發性氧化反應 [4]。因此，氧化物/抗氧化物間的不平衡可能在個人暴露於香煙之肺癌致癌機制上具有一定的角色。

表觀遺傳 (epigenetic) 為核酸序列並未改變，但卻改變了基因的表現型態；表觀遺傳修飾包括DNA甲基化 (methylation)、組織蛋白 (histone) 修飾以及核小體定位 (nucleosome positioning) [6]。DNA高度甲基化是表觀遺傳機制對於許多基因默化 (silencing) 的主要關鍵，包括相關於細胞週期的調節 (cell cycle regulation)、接受體 (receptors)、DNA修復 (DNA repair) 與細胞凋零的基因 [7, 8]。在基因啟動子區域上的DNA序列發生了甲基化修飾作用，尤其是在 CpG相連的核酸序列，主要是利用S-adenosyl-methionine (SAM) 做為甲基的提供者，再以DNA甲基轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMTs]) 當作催化劑；DNMTs利用半胱氨酸 (cysteine) 與DNA鹼基胞嘧啶 (cytosine) 上第六個碳結合，造成鄰近第五個碳吸引SAM上的甲基結合以形成5'-methylcytosine [9]。在哺

乳動物中，啟動子區域的特徵為GC含量比例約為60-70%；因此，在啟動子上的CpG群島發生DNA甲基化以及影響基因表現的機率也較高 [10]。重要的是，抽菸也已經被建議可引起DNA甲基化，這可能是抽菸所引起的相關癌症之關鍵機制 [11]。哺乳動物中，DNMT酵素可被區分為DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B與DNMT3L五種 [12]。DNMT1為決定DNA甲基化的酵素，並且導致基因默化；DNMT2的活性較弱，但是仍具有影響力；DNMT3A與DNMT3B為參與DNA重新甲基化作用，而DNMT3L雖然不具有催化DNA甲基化的功能，但能夠將DNMT3A與DNMT3B去活化。在腫瘤中，已經觀察到兩種DNA甲基化酵素DNMT1與DNMT3B的活性具有增加的情形 [13, 14]。而香菸成分中重要的致癌物4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)，也被觀察到可導致DNMT1在肺癌細胞之細胞核中表現與累積 [11]。

茶多酚 (tea polyphenols)，即已知的兒茶素 (catechins)，通常在沖泡的綠茶中佔固體乾重的30-42% [15]；而茶 (發酵過之產物) 中主要的多酚類成分是茶黃素theaflavins (1-3%的乾重) 和茶紅素thearubigins (10-40%的乾重)。與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [16, 17]。在不同的實驗動物模式中，綠茶也被觀察到可以抑制多種致癌性物質所引發的肺癌腫瘤之形成，包括N-nitrosodiethylamine和NNK [18]。在另外的實驗中，綠茶多酚則防止了暴露於紫外線UVB輻射之無毛的SKH-1雌性小鼠的脂質過氧化物形成 [19]。並且，綠茶多酚也已經被顯示可抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 (apoptosis) [20, 21]；然而，目前這些抑制效應的機制還不清楚。有趣的是，先前研究也指出茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 在不同組織或癌症細胞中能夠有效地抑制

DNMT的活性，進一步地可能降低腫瘤的發生 [12, 22]。

而人類DNMT3B基因是位於染色體20q11.2的位置，在啟動子序列核苷酸-149的位置上包含了一個C至T的轉換，此核苷酸變異能夠增加30%啟動子的活性 [23]；此DNMT3B -149基因多形性也已經被觀察到與癌症的發生具有相關，包括肺癌 [23, 24]、乳癌 [25]、大腸癌 [26] 與胃癌 [27]。然而，我們有興趣更進一步地探討台灣人的DNMT3B基因型與肺癌發生危險之間的相關是否分別在不同抽菸與飲茶習慣者中存在著差異。我們假設在抽菸者中，攜帶DNMT3B -149 T對偶基因型者相較於C對偶基因型者，可能具有較高的啟動子活性，因此就容易因較多的DNA甲基化程度而導致肺癌的發生。但是，茶多酚能夠使DNMT3B甲基化的能力降低，如此的保護作用在飲茶者中則可能使DNMT3B甲基化對於肺癌發生危險的效應較不明顯。相反地，不飲茶者缺乏茶多酚對於DNMT3B甲基化的抑制作用；因此，攜帶DNMT3B T對偶基因型之不飲茶者所具有的肺癌發生危險效應將會是較明顯的。此外，抽菸與DNMT3B基因型、以及綠茶飲用與DNMT3B基因型對於肺癌發生之危險將是具有交互作用存在。

材料和方法

研究對象

本計畫是審核通過後始執行的。總計，共有204位原發性肺癌（國際疾病分類第10版；ICD10代碼C33-C34）病患從台中中山醫學大學附設醫院、台中澄清醫院、童綜合醫院被納入至本研究中，全部病例也由合格的病理學家執行一系列的病理階段檢查；腫瘤的類型和階段也依據世界衛生組織（World Health Organization [WHO]）的分類方式來決定 [28]。同時，408位潛在的對照是從不具

癌症病史的病患中隨機選取；他們是在相同的教學醫院執行身體健康檢查。

流行病學資料

所有參與者的同意書皆被獲取。結構式問卷所涵蓋的問題包括：人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜，實際烹煮情形以及肺癌家族史。研究對象的抽菸史包括每天抽菸的支數和抽菸年數；累積抽菸量是以抽菸包年計算，亦即每天的包數乘以抽菸的年數。水果及蔬菜的攝取也從當地普遍可獲得並且一般被攝取的種類中，計算出最近三年前的每週標準化平均餐數。肺癌家族史，則是定義為研究對象之一等親親屬具有肺癌。此外，過去家戶的烹飪暴露也被評估；而烹飪的暴露，研究對象被詢問關於各種烹飪方法的使用頻率，特別是他們平常的炒菜方式。

在台灣，茶壺裝盛每批茶葉的乾重約為3-5克，再倒入熱水沖泡（約150-250毫升），並且不加入任何的糖或牛奶等添加物，從茶壺沖泡出來的茶再倒入茶杯中飲用。通常沖泡的第一泡茶液會快速地被倒出不飲，第二泡約浸泡2-3分鐘後倒出，第三、四泡則約浸泡5分鐘後倒出飲用；同一批茶葉大約會回沖3-4次。在台灣用來飲用綠茶的茶杯體積較小（30-50毫升），故在面訪時依研究對象所描述之飲茶量轉換成標準容器的體積量（100-120毫升）。在我們的研究中，關於綠茶飲用的調查分為幾個回應做為分類。首先研究對象被詢問是否有飲用綠茶，回應為“曾經飲用綠茶者”則進一步地被詢問飲用綠茶量以及飲用綠茶年數。綠茶飲用的頻率則是從五個可能得到的答覆去評估，即每天一杯以上、一週三到四杯、一週一到二杯、一個月一到二杯或更少；接續詢問習慣飲用綠茶的年數。對於每天飲用綠茶者，每天所飲用的杯數也被進一步地確認。我們針對問題的答覆，根據

先前的一項追蹤研究，區分成五項類別：每天少於一杯、每天一至二杯、每天三至四杯、每天五至九杯、每天十杯以上 [29]。

DNMT3B基因多形性

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，並且被分離成為血漿、buffy coat和紅血球。這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C下；基因型的測定是從buffy coat萃取出DNA來進行。

根據Shen等人 [23] 的研究，DNMT3B基因多形性是在執行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR]) 增幅後，以限制片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 分析來辨識在DNMT3B基因之BfaI於啟動子限制酶辨識點的差異。一段包含此基因多形性的380 bp之基因體DNA片段被增幅，用以增幅DNMT3B基因的引發子 (primers) 序列為5'-TGC TGT GAC AGG CAG AGC AG-3'和5'-GGT AGC CGG GAA CTC CAC GG-3'。0.5 µl的DNA被加至包含200 ng的引發子、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM的dNTPs、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH = 8.3) 和0.1%的BSA的PCR緩衝劑中，最後總體積被調整為50 µl。PCR循環參數組成為95°C下五分鐘之先前培養，接續於95°C下30秒之變性步驟、63°C下90秒之重鍊、以及72°C下40秒之延展，共35回合循環，反應於最後的72°C十分鐘之延展後終止。PCR產物也在37°C下以5U的BfaI酵素消化16小時，消化產物於3%之瓊膠中以ethidium bromide染色後判讀。攜帶同型的DNMT3B CC基因型個體顯現出208、126和46 bp三段產物片段，同型的DNMT3B TT基因型個體表現出162、126和46 bp三段產物片段；而異型的DNMT3B CT基因型者則有208、162、126和46 bp四段產物片段。

統計分析

對於病例組與對照組的性別、收案時之年齡、抽菸狀況、抽菸包年、綠茶飲用、蔬菜與水果的攝取量、過往烹煮的暴露、與肺癌家族史之比較，若是連續性變項是以Student's *t*-test檢定；若是類別性變項則以 χ^2 -test或Fisher's exact test檢定。 χ^2 -test也被執行以檢定在病例組與對照組中DNMT3B基因型的盛行率差異。隨後，使用邏輯斯迴歸分析模式 (logistic regression model) 求取每個變項的調整後危險對比值 (adjusted odds ratio [OR]) 以及95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.])。另外，分層分析 (stratification) 被執行以檢定抽菸狀況、綠茶飲用量以及DNMT3B基因多形性之間是否對於肺癌發生危險性具有交互作用；所有的P值皆以雙尾檢定來計算。

結果

總計，共有612名研究對象 (381名男性與231名女性) 參與本研究，年齡範圍從38歲至93歲，其特徵整理於表一。在具有組織學確認為原發性肺癌之204名病例中，117名 (57.4%) 為肺腺癌以及51名 (25.0%) 為鱗狀細胞癌。研究對象中男性所佔的比例為62.3%，女性為37.7%；肺癌病患的平均年齡為66.6歲，對照為65.2歲。如同我們所預期的，相較於對照，肺癌病例中具有較多抽菸者 (55.4% vs. 31.1%；OR = 2.75；95% C.I. = 1.94-3.89)；35.8%的病例抽菸超過40包年，而在對照中此數值是16.0% (OR = 3.42；95% C.I. = 2.27-5.14)。在飲用綠茶的部分，肺癌病例相較於對照有較高比率之未飲用綠茶者 (79.9% vs. 64.9%)；在飲用綠茶的時間上，病例組也僅有9.3%超過十年，相較於對照組17.4%是具有顯著的差

異。然而，蔬果攝取在病例與對照組間並沒有顯著的差異。此外，相較於對照，炒菜油煙暴露以及肺癌家族史在病例組有較高的比例，並且此差異達到統計上的顯著性。研究對象之 DNMT3B 基因型的盛行率，顯示在表二。在病例組中，DNMT3B 的 C 與 T 對偶基因的頻率分別是2.9%以及97.1%，而對照組的 C 與 T 對偶基因的頻率分別是4.9%以及95.1%；基因型頻率分佈在病例組與對照組間並沒有顯著的差異 (OR = 1.70；95% C.I. = 0.88-3.27)。

隨後，我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險之相關 (表三)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT3B CT 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3B TT 基因型之非抽菸者具有1.03倍 (95% C.I. = 0.42-2.55) 的肺癌發生危險，攜帶 DNMT3B CT 基因型之抽菸者具有2.60倍 (95% C.I. = 0.63-10.75) 的肺癌發生危險；然而，攜帶 DNMT3B TT 基因型之抽菸者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 7.10，95% C.I. = 2.71-18.63)。並且，抽菸狀況與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性具有邊緣顯著的交互作用存在 (P = 0.08)。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 DNMT3B CT 基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3B TT 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 5.25，95% C.I. = 1.88-14.67)、以及攜帶 DNMT3B TT 基因型且抽菸包年為大於40包年者 (OR = 8.60，95% C.I. = 3.19-23.17) 分別具有顯著較高的肺癌發生危險性；並且，累積抽菸量與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性也具有顯著的交互作用存在 (P = 0.03)。

接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估DNMT3B基因型對於肺癌發生危險

性之相關 (表四)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶DNMT3B CT基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶DNMT3B TT基因型之飲用綠茶者並不具有顯著較高的肺癌發生危險性；而攜帶DNMT3B CT與TT基因型之未飲用綠茶者則具有5.06倍 (95% C.I. = 0.52-49.34) 與7.55倍 (95% C.I. = 0.87-65.60) 的肺癌發生危險性，但同樣地並未達到統計上的顯著性。

討論

現今的研究觀察到，抽菸與 DNMT3B 基因型對於肺癌的發生危險性具有顯著的交互作用存在；然而，我們並無法觀察到綠茶飲用與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性的交互作用。

DNMT3B 為 DNMT 家族中的一員，其功能可使基因重新甲基化；而且在 DNMT3B 啟動子序列核苷酸-149 的位置上包含了一個 C 至 T 的轉換，此核苷酸變異能夠增加 30% 啟動子的活性 [23]，並且此核苷酸變異也已經被觀察到與若干癌症的發生具有相關 [23-27]。在本研究中，攜帶 DNMT3B TT 基因型者相較於攜帶 CT 基因型者具有較高的肺癌發生危險，雖然如此的結果並未達到統計上的顯著性。原先一項於美國所執行的研究也觀察到，攜帶 DNMT3B -149 T 對偶基因者是相對於肺癌發生之增加危險 [23]。雖然，目前並不完全明瞭 DNMT3B -149 C→T 的置換對於 DNMT3B 表現的整體影響；然而，證據顯示在 DNMT3B 啟動子上的變異是可以增加啟動子活性，並且可能向上調控參與在一些抑癌基因 (tumor suppressor gene) 之 CpG 群島重新甲基化作用的基因之表現 [30, 31]。另一方面，Garzon 等人 [32] 則在大腸癌細胞株中觀察到，若阻斷 DNMT3B 的基

因表現，可減少 3% 全基因體 DNA 甲基化 (global DNA methylation)；然而，如果同時阻斷 DNMT3B 及 DNMT1 的基因表現，將可廢除 DNMT 的活性，並且可以減少 95% 的全基因體 DNA 甲基化。因此，我們現今結果並無法直接觀察到 DNMT3B 對於肺癌發生危險之獨立效應，建議著可能需要同時於肺癌發生危險性中評估 DNMT1 與 DNMT3B 的重要性。

香菸成分中的重要致癌物 NNK 已經被建議可以引起 DNA 甲基化，因而導致若干癌症的發生，包括肺癌 [11]。NNK 可以透過 AKT 路徑而減弱 β TrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3 β / β TrCP 蛋白降解體路徑去活化；並且也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，並將 β TrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，而在細胞核中大量累積，進而使抑癌基因的啟動子高度甲基化並造成基因默化，進而可能導致肺癌的發生 [11]。有趣的是，我們現今的研究在吸菸者中觀察到攜帶 DNMT3B TT 基因型者相較於攜帶 DNMT3B CT 基因型者具有較高的肺癌發生危險性；並且，抽菸狀態與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性也具有明顯的交互作用存在。然而，如此的觀察在未來仍需要進一步的功能性研究來加以確認，例如驗證 NNK 可否透過 AKT 路徑來使 DNMT3B 蛋白累積。

許多實驗研究報告顯示，綠茶可能抑制許多由物理性及化學性致癌物所引發的癌症 [18]；而與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [16, 17]。茶多酚明顯地是種強抗氧化物，並且可以有效地清除自由基，它們也可能預防致突變性和基因毒性，抑制腫瘤的起始、促進、以及細胞增生；調控去毒性酵素，並且清除致癌物的活化代謝產物 [18, 33]。茶多酚也已經被顯示，可抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 [20,

21]。這些證據支持著我們的結果，未飲用綠茶者相較於飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險。特別的是，我們先前的研究也發現 [34]，綠茶飲用與抽菸對於肺癌之發生危險是具有交互作用存在的；未飲用綠茶者較飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險性，而在吸菸者中此效應更為明顯。

在基因啟動子區域上的 DNA 序列發生了甲基化修飾作用，尤其是在 CpG 相連的核酸序列，主要是利用 SAM 做為甲基的提供者，再以 DNMTs 當作催化劑 [9]。此外，先前的研究指出茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 [EGCG] 在不同組織或癌症細胞中能夠抑制 DNMT 的活性，進而可能降低腫瘤的發生 [12, 22]。而茶多酚可能透過兩種機制來參與抑制 DNA 的甲基化，一是茶多酚可以直接抑制 DNMT 的活性，另一則是茶多酚間接藉由兒茶酚-O-甲基轉移酶 (catechol-O-methyltransferase[COMT]) 來減少 SAM，導致 DNMT 作用被抑制。然而，在我們的研究中並未觀察到綠茶與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性的交互作用，原因可能是因為我們研究對象的樣本數不足，限制了相關的統計檢定力。此外，我們並無法實際評估茶多酚於人體中之生物利用度，也未能評估 COMT 基因的角色。未來的研究應該致力於瞭解 COMT 基因對於綠茶所抑制肺癌相關之 DNA 甲基化的影響，並且評估綠茶飲用對於其他 DNMT 甲基化表現與肺癌發生關係之影響。

許多人類的觀察研究建議蔬果的攝取對於肺癌的預防是有益的，大部分的證據傾向於蔬果攝取與肺癌危險呈現反向關係；但是在一項西班牙的病例對照研究中，並沒有發現蔬果攝取對於肺癌具有保護效應[36]。我們的結果也顯示，蔬果攝取與肺癌危險並沒有相關存在。可能的原因是利用問卷去估計蔬果攝取量是無法準確評估實際的攝取量，並且造成估計上的偏差；對於多數研究對象而言，估

計特定種類的蔬果攝食頻率是有困難的。蔬果攝取量與肺癌危險之間的關係，仍有待進一步的研究來加以釐清。烹飪油煙的複雜成分中，芳香雜環化合物 (aromatic heterocyclic amines [HCAs]) 是主要的致癌物，並且與肺癌相關 [37]。在我們的研究中，炒菜油煙每週暴露的時間對於肺癌發生危險有一個趨勢關係存在；特別在炒菜油煙每週暴露大於三小時以上者具有較高的肺癌發生危險。另外，我們也去詢問病例以及對照其肺癌家族史，並且病例相較於對照具有較高比例的肺癌家族史。這項結果顯示，肺癌的家族危險性可能是歸因於遺傳因子或是共同的環境因子。

我們的研究中，健康對照的 DNMT3B T 對偶基因頻率為 95.1%，是接近於過去華人研究所報告的頻率 (97.8%) [38]；而且我們研究對象之 DNMT3B 基因多形性的頻率也符合哈溫定律，證實著我們基因型技術的可信性和成果。在本研究中，我們的研究對象樣本數較少，因此經過分層分析後，會限制基因型與肺癌發生危險相關判定的檢定力；並且使用問卷詢問綠茶飲用量以及茶品種類的錯誤分類，可能無法準確評估綠茶實際攝取的劑量。因此，未來仍需增加研究對象的樣本數以及設計更有效的研究方法，以更確立我們的結果。

我們的結果建議著，在抽菸者中，DNMT3B TT 基因型可能增加啟動子的活性，進而造成 DNA 高度甲基化，而導致肺癌的發生。

參考文獻

1. Boyle P. Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. *Lung Cancer*. 12(3):167-81, 1995.
2. Hoffmann D. Djordjevic MV. Hoffmann I. The changing cigarette. *Prev Med*. 26(4):427-34, 1997.

3. Church DF. Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* 64:111-26, 1985.
4. Pryor WA. Prier DG. Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect.* 47:345-55, 1983.
5. Pryor WA. Hales BJ. Premovic PI. et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science.* 220(4595):425-7, 1983.
6. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 358(11):1148-59, 2008.
7. Jones PA. Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3(6):415-28, 2002.
8. Jones PA. Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 293(5532):1068-70, 2001.
9. Taby R. Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin.* 60(6):376-92, 2010.
10. Saxonov S. Berg P. Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(5):1412-7, 2006.
11. Lin RK. Hsieh YS. Lin P. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *J Clin Invest.* 120(2):521-32, 2010.
12. Tang M. Xu W. Wang Q. et al. Potential of DNMT and its epigenetic regulation for lung cancer therapy. *Curr Genomics.* 10(5):336-52, 2009.
13. Clark SJ. Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene.* 21(35):5380-7, 2002.
14. Saito Y. Kanai Y. Nakagawa T. et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant

- potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*. 105(4):527-32, 2003.
15. Balentine DA. Wiseman SA. Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 37(8):693-704, 1997.
 16. Wiseman SA. Balentine DA. Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 37(8):705-18, 1997.
 17. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med*. 220(4):262-6, 1999.
 18. Yang CS. Wang ZY. Tea and cancer. *Natl Cancer Inst*. 85(13):1038-49, 1993.
 19. Vayalil PK. Elmets CA. Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*. 24(5):927-36, 2003.
 20. Yang GY. Liao J. Li C. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis*. 21(11):2035-9, 2000.
 21. Yang GY. Liao J. Kim K. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*. 19(4):611-6, 1998.
 22. Fang MZ. Wang Y. Ai N. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*. 63(22):7563-70, 2003.
 23. Shen H. Wang L. Spitz MR. et al. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung

- cancer. *Cancer Res.* 62(17):4992-5, 2002.
24. Lee SJ. Jeon HS. Jang JS. et al. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis.* 26(2):403-9, 2005.
 25. Montgomery KG. Liu MC. Eccles DM. et al. The DNMT3B C→T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 6(4):R390-4, 2004.
 26. Fan H. Zhang F. Hu J. et al. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of colorectal cancer in Chinese: a case-control study. *Exp Clin Cancer Res.* 27:24, 2008.
 27. Hu J. Fan H. Liu D. et al. DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 55(4):1011-6, 2010.
 28. Anonymous. *Histological typing of lung tumors (2nd ed.)*. World Health Organization, Geneva, 1981.
 29. Tsubono Y. Nishino Y. Komatsu S. et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med.* 344(9):632-6, 2001.
 30. Okano M. Bell DW. Haber DA. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99(3):247-57, 1999.
 31. Robertson KD. Uzvolgyi E. Liang G. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27(11):2291-8, 1999.
 32. Garzon R. Liu S. Fabbri M. et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood.* 113(25):6411-8, 2009.

33. Ahmad N. Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev.* 57(3):78-83, 1999.
34. Lin IH. Ho ML. Chen HY. et al. Smoking, green tea consumption, genetic polymorphisms in the insulin-like growth factors and lung cancer risk. *PLoS One.* 7(2):e30951, 2012.
35. Lee WJ. Shim JY. Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNAmethyltransferases by teacatechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol.* 68(4):1018-30, 2005.
36. Ruano-Ravina A. Figueiras A. Dosil-Diaz O. et al. A population-based case-control study on fruit and vegetable intake and lung cancer: a paradox effect? *Nutr Cancer.* 43(1):47-51, 2002.
37. Seow A. Poh WT. Teh M. et al. Fumes from meat cooking and lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(11):1215-21, 2000.
38. Chen Z. Zhou Z. Chen X. et al. Single Nucleotide polymorphism in DNMT3B promoter and the risk for idiopathic thrombocytopenic purpura in Chinese population. *J Clin Immunol.* 28(5):399-404, 2008.

表一：肺癌病例與對照之人口學特徵的頻率分佈

變項	病例 N = 204	對照 N = 408	OR (95% C.I.) ^a
性別			
女	77 (37.7%)	154 (37.7%)	1.00
男	127 (62.3%)	254 (62.3%)	1.00 (0.71-1.41)
年齡 (歲, 平均 ± 標準差)	66.6 ± 11.3	65.2 ± 11.3	
≤ 50	18 (8.8%)	39 (9.5%)	1.00
51-59	37 (18.1%)	88 (21.6%)	0.91 (0.46-1.79)
≥ 60	149 (73.1%)	281 (68.9%)	1.15 (0.64-2.08)
抽菸狀況			
無	91 (44.6%)	281 (68.9%)	1.00
有	113 (55.4%)	127 (31.1%)	2.75 (1.94-3.89) ^{***}
抽菸包年			
0	91 (44.6%)	281 (68.9%)	1.00
1-39	40 (19.6%)	61 (14.9%)	2.03 (1.27-3.22) ^{**}
≥ 40	73 (35.8%)	66 (16.2%)	3.42 (2.27-5.14) ^{***}
飲用綠茶 (杯/天)			
≥ 1	13 (6.4%)	84 (20.6%)	1.00
< 1	28 (13.7%)	59 (14.5%)	3.07 (1.47-6.41) ^{**}
0	163 (79.9%)	265 (64.9%)	3.97 (2.15-7.36) ^{***}
飲用綠茶年數 (年)			
> 10	19 (9.3%)	71 (17.4%)	1.00
≤ 10	22 (10.8%)	72 (17.7%)	1.14 (0.57-2.29)
0	163 (79.9%)	265 (64.9%)	2.30 (1.34-3.95) ^{**}
蔬果攝取 (餐/週)			
≥ 21	100 (49.0%)	202 (49.5%)	1.00
15-20	52 (25.5%)	72 (17.7%)	0.78 (0.53-1.17)
≤ 14	52 (25.5%)	134 (32.8%)	1.46 (0.95-2.24)
炒菜油煙 (時/週)			
< 1	167 (81.9%)	378 (92.7%)	1.00
1-3	18 (8.8%)	17 (4.1%)	3.31 (1.60-6.86) ^{**}
≥ 3	19 (9.3%)	13 (3.2%)	2.40 (1.21-4.77) [*]
肺癌家族史			
無	192 (94.1%)	401 (98.3%)	1.00
有	12 (5.9%)	7 (1.7%)	1.73 (1.16-2.57) ^{**}
病理型態			
腺癌	117 (57.4%)		
鱗狀細胞癌	51 (25.0%)		
其他 ^b	36 (17.6%)		

^a以邏輯斯迴歸分析模式計算。

^b其他包括小細胞癌 (n = 8)、大細胞癌 (n = 1)、混和細胞癌 (n = 6) 與未分類 (n = 21)。

* 0.01 < P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

表二：肺癌病例與對照之 DNMT3B 基因型的頻率分佈

變項	病例 N = 204	對照 N = 408	OR (95% C.I.) ^a
DNMT3B			
CC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
CT	12 (5.9%)	40 (9.8%)	1.00
TT	192 (94.1%)	368 (90.2%)	1.74 (0.89-3.39)
C對偶基因	12 (2.9%)	40 (4.9%)	1.00
T對偶基因	396 (97.1%)	776 (95.1%)	1.70 (0.88-3.27)

^a以邏輯斯迴歸分析模式計算。

表三：在抽菸狀況及抽菸包年分組中，不同 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險之相關

變項	DNMT3B CT 基因型			DNMT3B TT 基因型		
	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a
抽菸狀況						
非抽菸者	7	25	1.00	84	256	1.03 (0.42-2.55)
抽菸者	5	15	2.60 (0.63-10.75)	108	112	7.10 (2.71-18.63)*
交互作用檢定			$\chi^2 = 3.13$ (1 df); P= 0.08			
抽菸包年						
0	7	25	1.00	84	256	1.03 (0.41-2.54)
1-39	2	7	2.10 (0.33-13.42)	38	54	5.25 (1.88-14.67)*
≥ 40	3	8	3.06 (0.54-17.27)	70	58	8.60 (3.19-23.17)*
交互作用檢定			$\chi^2 = 6.76$ (2 df); P= 0.03			

^a以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露和肺癌家族史的效應。

*P< 0.001。

表四：在綠茶飲用狀況及飲用綠茶量分組中，不同 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險之相關

變項	DNMT3B CT 基因型			DNMT3B TT 基因型		
	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a
飲用綠茶狀況						
飲茶者	2	11	1.00	39	132	1.56 (0.17-14.62)
未飲茶者	10	29	5.06 (0.52-49.34)	153	236	7.55 (0.87-65.60)
交互作用檢定	$\chi^2 = 1.14$ (1 df); P= 0.29					
綠茶飲用年數						
> 10	2	6	1.00	17	65	1.04 (0.18-6.09)
≤ 10	10	34	1.70 (0.27-10.78)	175	303	2.72 (0.50-14.82)
交互作用檢定	$\chi^2 = 1.36$ (1 df); P= 0.24					

^a以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露和肺癌家族史的效應。

第二章 抽菸、綠茶飲用、微型核糖核酸-29b (MicroRNA-29b) 與其標的基因 DNA 甲基轉移酶 3B (DNMT3B) 表現對於肺癌發生之效應

前言

香菸包含數千種化合物，其中很多是已知或者是疑似人類致癌物 [1, 2]；重要的是，肺癌與抽菸之穩定相關已經被廣泛地建立。實際上，香煙的焦油 (tar) 部分已經被顯示是苯醌 (quinone)/對苯二酚 (hydroquinone) 氧化還原反應的複雜混合物 [3-5]，具有催化產生過氧化陰離子的能力；氣態煙則包含穩定濃度的游離基，可導致氮氧化物對於在煙流中之低分子量碳氫化合物引動自發性氧化反應 [6]。因此，氧化物/抗氧化物間的不平衡可能在個人暴露於香煙之肺癌致癌機制上具有一定的角色。茶已經受到極大地關注，因為茶多酚是種強抗氧化物，並且茶品已經顯示出對抗腫瘤發展的抑制能力 [6, 7]。在不同的實驗動物模式中，綠茶也被觀察到可以抑制多種致癌性物質所引發的肺癌腫瘤之形成，包括 N-nitrosodiethylamine 和 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) [7]。此外，綠茶多酚可以防止暴露於紫外線 UVB 輻射之無毛的 SKH-1 雌性小鼠的脂質過氧化物形成 [8]；並且，綠茶多酚也可以抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 (apoptosis) [9, 10]。然而在目前，對於茶多酚在癌症之確實抑制效應仍然不清楚。

表觀遺傳 (epigenetic) 為核酸序列並未改變，但卻改變了基因的表現型態；表觀遺傳修飾包括 DNA 甲基化 (methylation)、組織蛋白 (histone) 修飾、以及核小體定位 (nucleosome positioning) [11]。DNA 高度甲基化是表觀遺傳機制對於許多基因默化 (silencing) 的關鍵，包括相關於細胞週期的調節 (cell cycle

regulation)、接受體 (receptors)、DNA 修復 (DNA repair)、與細胞凋零的基因 [12, 13]。在基因啟動子區域上的 DNA 序列發生了甲基化修飾作用，尤其是在 CpG 相連的核酸序列，主要是利用 S-adenosyl-methionine (SAM) 做為甲基的提供者，再以 DNA 甲基轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMT]) 當作催化劑；DNMT 利用半胱氨酸 (cysteine) 與 DNA 鹼基胞嘧啶 (cytosine) 上第六個碳結合，造成鄰近第五個碳吸引 SAM 上的甲基結合以形成 5'-methylcytosine [14]。在哺乳動物中，DNMT 可被區分為 DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B、與 DNMT3L 五種 [15]。DNMT1 為決定 DNA 甲基化的酵素，並且導致基因默化；DNMT2 的活性較弱，但是仍具有影響力；DNMT3A 與 DNMT3B 參與 DNA 重新甲基化作用，而 DNMT3L 雖然不具有催化 DNA 甲基化的功能，但能夠將 DNMT3A 與 DNMT3B 去活化。在腫瘤中，已經觀察到 DNMT1 與 DNMT3B 的活性具有增加的情形 [16, 17]。有趣的是，先前研究也指出茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 在不同組織或癌症細胞中能夠有效地抑制 DNMT 的活性，進一步地可能降低腫瘤的發生 [15, 18]。

微型核糖核酸 (microRNA [miRNA]) 是一段長約 20-22 個核苷酸，結構上是長髮夾型的單股 RNA 分子 [19]。miRNA 可經由類似 RNA 干擾 (RNA interference [RNAi]) 的機制將 RNA 降解，也可以鍵結在目標 mRNA 的 3'端非編碼區 (untranslated region [UTR])，以抑制 mRNA 的轉譯 [20]。miR-29 家族，可分為 miR-29a、miR-29b、以及 miR-29c；有趣的是，miR-29b 可以減少 DNMT3 家族的活性，並且會直接標的鍵結在 DNMT3A 與 DNMT3B 的 3'UTR 端，進而使已被甲基化而默化的抑癌基因 (tumor suppressor genes) 再表現以及改變細胞凋亡的影響 [21, 22]。

重要的是，茶多酚可在癌症細胞中抑制 DNMT3B 的表現 [15, 18]；一項最近的研究也在 apoE 基因剔除的小鼠中觀察到，多酚可反向調控受到 apoE 突變所影響的 miR-29 表現，並使之回復正常 [23]。因此，我們有興趣探討抽菸、綠茶飲用、miR-29b 與其標的基因 DNMT3B 表現和肺癌發生的相關。

材料與方法

研究對象

在我們的研究過程中，對於病患與健康參與者的實驗以及病患的個案史都是符合赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki)，並且獲取所有研究對象的書面同意書，研究設計並由參與本研究之機構的倫理委員會 (institutional review board) 所批准。總計，71 位原發性肺癌 (國際疾病分類第 10 版；ICD10 代碼 C33-C34) 病患是從台中中山醫學大學附設醫院、台中澄清醫院、以及童綜合醫院被納入至本研究中，全部病例也由合格的病理學家執行一系列的病理階段檢查；腫瘤的類型和階段也依據世界衛生組織 (World Health Organization) 的分類方式來決定 [24]；其中 52 名 (73.0%) 為肺腺癌 (adenocarcinoma) 以及 14 名 (19.7%) 為鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma)。同時，71 位潛在的對照是從不具癌症病史的病患中隨機選取，他們是在相同的教學醫院執行身體檢查。

流行病學資料

結構式問卷所涵蓋的問題包括：人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜、實際烹煮情形、以及肺癌家族史。研究對象的抽菸史包括每天抽菸的支數和抽菸年數；累積抽菸量是以抽菸包年計算，亦即每天的包數乘

以抽菸的年數。水果及蔬菜的攝取也從當地普遍可獲得並且一般被攝取的種類中，計算出最近三年前的每週標準化平均餐數。肺癌家族史，則是定義為研究對象之一等親親屬具有肺癌。此外，過去家戶的烹飪暴露也被評估；研究對象被詢問關於各種烹飪方法的使用頻率，特別是他們平常的炒菜方式。

在台灣，茶壺裝盛每批茶葉的乾重約為 3-5 克，再倒入熱水沖泡（約 150-250 毫升），並且不加入任何的糖或牛奶等添加物，從茶壺沖泡出來的茶再倒入茶杯中飲用。通常沖泡的第一泡茶液會快速地被倒出不飲，第二泡約浸泡 2-3 分鐘後倒出，第三、四泡則約浸泡 5 分鐘後倒出飲用；同一批茶葉大約會回沖 3-4 次。在台灣用來飲茶的茶杯體積較小（30-50 毫升），故在面訪時依研究對象所描述之飲茶量轉換成標準容器的體積量（100-120 毫升）。在我們的研究中，關於綠茶飲用的調查分為幾個回應做為分類。首先研究對象被詢問是否有飲用綠茶，回應為“曾經飲用綠茶者”則進一步地被詢問飲用綠茶量以及飲用綠茶年數。綠茶飲用的頻率則是從五個可能得到的答覆去評估，即每天一杯以上、一週三到四杯、一週一到二杯、以及一個月一到二杯或更少；接續詢問習慣飲用綠茶的年數。對於每天飲用綠茶者，每天所飲用的杯數被進一步地確認。我們也針對問題的答覆，根據先前的一項追蹤研究，區分成五項類別：每天少於一杯、每天一至二杯、每天三至四杯、每天五至九杯、以及每天十杯以上 [25]。為了避免個人在疾病診斷後改變其飲茶習慣而造成對於飲茶攝取的錯誤分組 (misclassification)，我們僅收集在疾病發生前的累積量。在本研究中，綠茶飲用是根據一項先前的研究來評估的 [26]，該研究使用問卷以及根據一年內三天的飲食紀錄來評估綠茶飲用量，兩者間的斯皮爾曼相關係數 (Spearman's correlation coefficient) 為 0.66；並且藉由兩份問卷評估相隔六個月前後之綠茶飲用量，兩者之間的斯皮爾曼相關係數也

為 0.66。因此，問卷可能導致無差異性的錯誤分組，因而造成結果被低估。以類似的方法來評估綠茶飲用也在其他的研究中被運用 [26, 27]，這意味著此評估方法具有一定的效度。此外，不管是病例還是對照，他們都對於本研究要探討綠茶飲用的目的並不清楚；因此，參與者是不太可能在綠茶飲用的資訊上產生偏差。

RNA 萃取

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，而這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C 下。RNA 的萃取是從血液樣本抽離出 buffy coat 並置於微量離心管中，加入 1 ml TRIzol 試劑後，靜置冰上 20 分鐘，再加入 200 µl DZPC-氯仿混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，將上清液移置新的微量離心管；再加入 500 µl 之 99% isopropanol，混合均勻後置於-20°C 下 10 分鐘。再於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘後，移去上清液，並且加入 1 ml 75%之 RNA-ethanol 混合均勻。於 4°C 下離心 12000 rpm 15 分鐘，移去上清液；待 RNA 沉澱物乾燥後，加入無 RNase 之去離子水將沉澱物溶解。接著進行 RNA 定量：將 RNA 以 DEPC-treated water 稀釋 25 倍，使用分光光度計在 260 nm 與 280 nm 波長下測量總 RNA 的濃度 (比值需大於 1.8)，吸光值即為 RNA 濃度 (µg/µl)。

miR-29b 與 DNMT3B mRNA 之反轉錄與即時定量聚合酶鏈鎖反應

TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems, CA, USA) 被應用於定量 miR-29b。首先進行反轉錄 (reverse transcription [RT])，取 5 µl 待測之 miRNA 加入 0.15 µl dNTP、1.0 µl RTase、1.5 µl 10x RT buffer、0.19 µl RNase 抑制劑、3 µl

5x RT 引子、以及 4.16 μ l 無 Nuclease 之去離子水；miR-29b 引子分別為 forward：5'-GCT GGT TTC ACA TGG TGG C-3' 與 reverse：5'-AAC ACT GAT TTC AAA TGG TG-3'，反應條件如下：16°C 30 分鐘、42°C 30 分鐘、85°C 5 分鐘。反應完畢後補上 5 μ l 無 Nuclease 之去離子水，以進行後續的聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR])。取 5 μ l 反轉錄後的 cDNA，加入 1 μ l 20x 引子、10 μ l 2x Master Mix、以及 4 μ l 無 Nuclease 之去離子水置於 96 孔盤中並進行二重複。以 RNU6B 當作內部對照，RNU6B 引子分別為 forward：5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3' 與 reverse：5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'；PCR 循環條件為 95°C 15 分鐘、95°C 15 秒、60°C 1 分鐘，共 40 回合。進行 PCR 的儀器是使用 ABI PRISM 7000 Real Time RT-PCR System and TaqMan Gene Expression probe (Applied Biosystems)，以光纖管即時紀錄每一個 cycle 的螢光訊號，來定量經由 PCR 放大的基因片段。在 PCR 的過程中，當螢光訊號超過閾值時，此時的循環數則被認定為循環閾值 (cycle threshold [Ct])；而公式 $2^{-\Delta Ct}$ 可應用於計算 miR-29b 在血液中的相對表現量， $\Delta Ct = Ct(\text{待測基因}) - Ct(\text{對照基因})$ 。

DNMT3B mRNA 之反轉錄反應是使用 RT-PCR kit (Promega) 所進行反應，取 2 μ g 的總 RNA 加熱 70°C 10 分鐘後，隨即放置冰浴中冷卻 2 分鐘，再加入 4 μ l 的 5 倍 MMLV buffer、2 μ l 的 10 mM dNTP、0.5 μ l 的 recombinant RNasin Ribonuclease 抑制劑 (40 U/ μ l)、0.5 μ l 的 MMLV Reverse transcriptase RNase H(-)point mutant、1 μ l 的 Random 引子 (500 ng/ μ l)、以及無 RNase 之去離子水補至最終體積為 20 μ l。於 PCR 儀器中進行下列反應：42°C 90 分鐘、72°C 10 分鐘、4°C 5 分鐘來合成 cDNA，儲存於 -20°C 下備用。使用 standard SYBR Green PCR kit 進行 DNMT3B 定量分析，DNMT3B 引子分別為 forward：5'-TAT CCG CAC CCC

GGA GAT-3'與 reverse : 5'-ATC GCC TGT CAA GTC CTG TGT-3'。寡核苷酸藉由 TIB Molbiol Inc 形成，每管反應物包含了 25 μ l Fast Start TaqMan Probe Master、0.5 μ l UPL 探針、0.5 μ l forward 引子、0.5 μ l reverse 引子、18 μ l 無 Nuclease 之去離子水、以及 5 μ l RNA。使用 GAPDH 當作內部對照，使加入 PCR 反應中的不同 cDNA 總量可以標準化；GAPDH 的放大使用 UPL Reference Gene Assays，反應物含有 10 μ l FastStart TaqMan Probe Master、0.5 μ l 探針、0.5 μ l 引子混合物、以及 4 μ l 無 Nuclease 之去離子水。GAPDH 引子分別為 forward:5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC ATC-3'與 reverse : 5'-GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT-3'。PCR 反應開始於 42°C 5 分鐘、95°C 3 分鐘；接下來進行 40 回合循環：95°C 3 秒、69°C 30 秒；根據 Ct 值來計算待測之 DNMT3B mRNA 的相對表現量。

統計分析

病例組與對照組的性別、收案時之年齡、抽菸狀況、抽菸包年、綠茶飲用量、蔬菜與水果的攝取量、過往烹煮的暴露、肺癌家族史，若為連續性變項以平均值 \pm 標準差表示，並以 Student's *t*-test 進行檢定；若為類別性變項則以個數與百分比呈現，以 χ^2 -test 或 Fisher's exact test 檢定兩組之分佈。以 Kolmogorov-Smirnov test 檢定 miR-29b (P = 0.010) 與 DNMT3B mRNA (P = 0.010) 表現量之分佈，結果呈現為非常態分佈；因此，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量在各變項間之分層中，則以中位數 (最小值-最大值) 來呈現，並且以 Wilcoxon rank-sum test 或 Kruskal-Wallis test 進行分析。隨後，依據對照組其 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現之第三分位數區分為高度表現與低度表現兩組，並且使用邏輯斯迴歸模式 (logistic regression model) 求取每個變項的危險對比值 (odds ratio [OR]) 以及

95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.])。另外，在不同的抽菸狀況以及綠茶飲用狀況分層中，分別檢定 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現程度對於肺癌發生危險之交互作用，交互作用是藉由概似比檢定 (likelihood ratio test) 以計算 χ^2 值與 P 值；在交互作用的檢定中，將僅具有主效應項 (main effects terms) 的邏輯斯迴歸模式與同時具有主效應項和交互作用項 (interaction term) 的模式進行比較。所有的 P 值皆以雙尾檢定來計算，並且以 $P < 0.05$ 定義為顯著性，全部數據以 SAS 9.4 來分析。

結果

總計 142 名研究對象參與本研究，年齡範圍從 23 歲至 94 歲，其特徵整理於表一。在研究對象中，男性的比例為 60.6%，女性為 39.4%；肺癌病患的平均年齡為 63.6 歲，對照為 52.6 歲，並且在兩組間具有顯著差異 ($P < 0.001$)。相較於健康對照，有 26.8% 的病患抽菸超過 40 包年，而在對照組中是 8.4% (OR = 4.16；95% C.I. = 1.50-11.52)。然而，飲用綠茶、蔬果攝取、炒菜油煙、以及肺癌家族史在病例與對照組間的分佈並沒有顯著差異。

miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量在肺癌病患與對照的人口學分組中之分佈，分別呈現於表二以及表三；由於 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量呈現非常態分佈，因此其數值在此以中位數 (最小值-最大值) 來呈現。我們的肺癌病例相較於健康對照在年齡 ≤ 50 歲者 ($P = 0.028$, Wilcoxon rank-sum test) 以及無抽菸者 ($P = 0.003$) 中，分別具有顯著較低的 miR-29b 表現量；並且在健康對照中，有抽菸習慣者相較於無抽菸習慣者也具有顯著較低的 miR-29b 表現量 (42 vs. 128; $P = 0.043$)。在肺癌病例中，抽菸者相較於無抽菸者具有顯著較高的 DNMT3B

mRNA 表現量 (41 vs. 23 ; P = 0.041)。而在抽菸 1-39 包年 (P = 0.066) 以及未飲用綠茶者 (P = 0.052) 者中，肺癌病例相較於對照則分別具有較高的 DNMT3B mRNA 表現量。此外，未飲用綠茶的肺癌病例相較於每天飲用綠茶小於 1 杯或大於 1 杯的肺癌病例也具有較高的 DNMT3B mRNA 表現量 (51 vs. 24 vs. 24; P = 0.067, Kruskal-Wallis test)；同樣地，未飲用綠茶的肺癌病例相較於飲用綠茶少於等於 10 年以及大於 10 年的肺癌病例也具有較高的 DNMT3B mRNA 表現量 (51 vs. 24 vs. 20 ; P = 0.073)。在對照之中，有肺癌家族史者相較於無肺癌家族史者具有顯著較低的 DNMT3B mRNA 表現量 (10 vs. 30; P = 0.014)。然而，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量在不同的蔬果攝取與炒菜油煙分組間並未具有統計顯著差異。

隨後，我們評估 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生之合併效應 (表四)。以對照的 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現量之第三分位數來區分為高度表現與低度表現，並以 miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者為參考組。在調整性別、年齡、與抽菸狀況的效應後，miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、以及 miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者分別相較於參考組具有 4.07 倍 (95% C.I. = 0.82-20.26)、4.11 倍 (95% C.I. = 0.60-28.08)、以及 2.45 倍 (95% C.I. = 0.57-10.59) 之肺癌發生危險性。進一步地，我們將 miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、miR-29b 高度表現/DNMT3B mRNA 高度表現者、以及 miR-29b 低度表現/DNMT3B mRNA 低度表現者，合併在一起以增加統計檢定力，他們相較於參考組也具有 3.36 倍 (95% C.I. = 1.11-10.17 ; P = 0.032) 的顯著肺癌發生危險。然而，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌的發生並不具有顯著的交互作用。

接續，我們分別評估抽菸狀況與 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用（表五）。在調整性別與年齡的效應後，miR-29b 低度表現之抽菸者、miR-29b 高度表現之抽菸者、以及 miR-29b 低度表現之無抽菸者分別相較於 miR-29b 高度表現之無抽菸者具有 9.17 倍 (95% C.I. = 1.52-55.34)、12.10 倍 (95% C.I. = 1.42-102.82)、以及 3.28 倍 (95% C.I. = 0.59-18.24) 之肺癌發生危險性；並且，抽菸狀況與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險具有顯著的交互作用 ($P = 0.026$)。同樣地，DNMT3B mRNA 高度表現之抽菸者、DNMT3B mRNA 低度表現之抽菸者、以及 DNMT3B mRNA 高度表現之無抽菸者相較於 DNMT3B mRNA 低度表現之無抽菸者分別具有 8.09 倍 (95% C.I. = 2.17-30.11)、2.54 倍 (95% C.I. = 0.88-7.37)、以及 1.06 倍 (95% C.I. = 0.32-3.52) 之肺癌發生危險性；並且，抽菸狀況與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用 ($P = 0.017$)。

最後，我們評估綠茶飲用分別與 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用（表六）。在調整性別、年齡、與抽菸狀況的效應後，DNMT3B mRNA 高度表現之未飲茶者相較於 DNMT3B mRNA 低度表現之飲茶者具有 3.71 倍 (95% C.I. = 0.93-14.82) 之肺癌發生危險性；並且綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險具有顯著的交互作用 ($P = 0.011$)。然而，綠茶飲用與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險並沒有顯著的合併效應。

討論

我們現今的研究發現，合併攜帶 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現者具有顯著較高的肺癌發生危險。此外，抽菸分別與 miR-29b 和 DNMT3B

mRNA 表現對於肺癌的發生具有顯著的交互作用；並且綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險也具有顯著的交互作用。

原先一項於美國所執行的肺癌研究觀察到，miR-29 家族的表現與 DNMT3B 的表現是呈現負相關，並且 miR-29b 可以向下調控 DNMT 的表現 [21]。此外，在肺癌細胞株中，miR-29b 表現的增加可以減少全體基因甲基化以及恢復抑癌基因的表現，進而抑制腫瘤的發生 [21]。我們現今的結果顯示，年齡 ≤ 50 歲之肺癌病例相較於對照具有顯著較低的 miR-29b 表現；並且，年齡 ≥ 60 歲者也具有相同的情形，雖然如此的結果並未達到統計顯著性，而這可能是較少的樣本數所導致。此外，在無抽菸者中，肺癌病例相較於對照也具有顯著較低的 miR-29b 表現量。但是，我們觀察到抽菸者與無抽菸者的結果卻是相反的；這原因是有二名具抽菸習慣的對照（抽菸包年數分別為 17 與 44）具有較低的 miR-29b 表現量（0.01 與 3.07），若排除此二名對照，我們可以觀察到肺癌病例（中位數 67.3）相較於對照（中位數 82.8）仍具有較低的 miR-29b 表現。這也暗示著，此二名具抽菸習慣的對照雖未呈現疾病的發展，但仍具有疾病發展的危險傾向。香菸中的 NNK 已經被發現可以透過與 $\alpha 7nAChR$ 結合以促使 $\alpha 7nAChR$ 的活化，進而誘導在細胞質的 c-Src 被磷酸化 [28]，並且也會藉由此路徑將 β -catenin 蛋白活化 [29]。在細胞核中的 β -catenin 可與 TCF4 形成轉錄複合體 [30]，使得 c-Myc 蛋白能夠直接抑制 miR-29b [29]，而造成 DNMT3B mRNA 的表現增加，並且使抑癌基因的啟動子高度甲基化而造成基因默化，而導致肺癌的發生 [21]。因此，如同在我們的健康對照中，抽菸者相較於無抽菸者具有較低的 miR-29b 表現；並且，如此的表現可能是引起相關癌症發生的重要機制。另一方面，我們也在肺癌病例中觀察到，抽菸者相較於無抽菸者具有較高的 DNMT3B mRNA 表現。證據

顯示 NNK 也可以透過 AKT 路徑而減弱 β TrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3 β / β TrCP 蛋白降解體路徑去活化；也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，將 β TrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，並且使抑癌基因的啟動子高度甲基化並造成基因默化，進而可能導致肺癌的發生 [31]。因此，我們具有抽菸習慣的肺癌病例相較於無抽菸之肺癌病例具有較高的 DNMT3B mRNA 表現。

我們將 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現區分為高度與低度表現，當合併攜帶 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現者，則相較於同時攜帶 miR-29b 高度表現和 DNMT3B mRNA 低度表現者具有顯著增加的肺癌發生危險；雖然，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性並未具有顯著的交互作用。此結果反映著相較於同時是 miR-29b 高度表現與 DNMT3B mRNA 低度表現者，只要具有一項 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現即可以增加罹患肺癌的危險性。然而，目前的樣本數仍是不足以偵測出 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生的交互作用。有趣的是，我們現今的研究也觀察到抽菸狀況與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險性具有明顯的交互作用。同樣地，抽菸狀況與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性也具有明顯的交互作用。如此的結果可能反映著具有 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現者具有較高的 DNA 甲基化程度；而抽菸者除了具有產生影響 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現的物質暴露外 (如 NNK)，尚有其他致癌成份的暴露或相關效應。因此，個體同時具有抽菸與 miR-29b 低度表現或 DNMT3B mRNA 高度表現則可能更會增加肺癌的發生危險。

許多實驗研究顯示，綠茶可能抑制許多由物理性及化學性致癌物所引發的癌

症 [7]；而與飲茶相關的潛在效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [32, 33]。茶多酚可以有效地清除自由基，可能預防致突變性和基因毒性，抑制腫瘤的起始、促進、以及細胞增生；調控去毒性酵素，並且清除致癌物的活化代謝產物 [7, 34]。特別的是，茶多酚中的沒食子酸化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 在不同的癌症細胞中也顯示出能夠抑制 DNMT 的活性，進而可能降低腫瘤的發生 [15, 18]。而茶多酚可能透過兩種機制來參與抑制 DNA 的甲基化，一是茶多酚可以直接抑制 DNMT 的活性，另一則是茶多酚間接地藉由兒茶酚-O-甲基轉移酶 (catechol-O-methyltransferase) 來減少 SAM，導致 DNMT 作用被抑制。我們的研究觀察到沒有飲用綠茶的肺癌病例相較於健康對照具有較高的 DNMT3B mRNA 表現，雖然僅具有邊際顯著性；而飲用綠茶的肺癌病例與健康對照其 DNMT3B mRNA 表現則較低，並且兩者之間也不具有顯著差異。重要的是，綠茶飲用與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險性具有交互作用。如此的結果建議著未飲用綠茶者除了具有較低的預防突變性和基因毒性、甚至較低的清除自由基與致癌物的能力外，也對於 DNMT 與 DNA 甲基化具有較低的抑制能力。若個體同時具有 DNMT3B mRNA 高度表現並且未飲用綠茶，則更可能會增加罹患肺癌的危險。然而，我們並未觀察到綠茶飲用與 miR-29b 表現對於肺癌發生危險性的交互作用；這可能表示綠茶成份與 miR-29b 在肺癌發展的機制上可能較不具有關聯。此外，較少的樣本數可能也是造成如此結果的原因。在未來仍需要進一步的功能性研究，在肺癌的致病機轉上加以驗證我們現今所觀察到的結果。

許多研究已經觀察到蔬果的攝取對於肺癌的預防是有益的，大部分的證據傾向於蔬果攝取與肺癌呈現反向關係。但是，我們的結果顯示蔬果攝取與肺癌並沒

有相關存在。可能的原因是利用問卷並無法準確地評估實際的蔬果攝取量，並且造成估計上的偏差；對於多數研究對象而言，估計特定種類的蔬果攝取量是有困難的。烹煮油煙的複雜成分中，芳香雜環化合物 (aromatic heterocyclic amines) 是主要的致癌物，並且與肺癌相關 [35]。然而，在我們的研究中，炒菜油煙每週暴露的時間對於肺癌發生危險並沒有相關存在，原因可能是樣本數太少所導致。另外，我們也詢問病例以及對照其肺癌家族史，並且病例相較於對照具有較高比例的肺癌家族史。這項結果顯示，肺癌的家族危險性可能是歸因於遺傳因子或是共同的環境因子。

對於血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現的測定，我們是以即時定量 PCR 進行二重複實驗，而二重複實驗所獲得的 Ct 值之差必須在 0.5 以內才能接受；因此，我們的實驗技術是具有良好的的一致性。然而，在我們的研究中，大部分肺癌病患好發於較高年齡，我們並未找到與肺癌病患年齡合適配對的健康對照；因此，年齡在肺癌病患與健康對照之間具有著明顯的差異。此外，我們的研究對象個數較少；因此會限制血液 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌危險性相關判定的檢定力。因此，未來仍須增加研究對象的樣本數以及設計更有效的研究方法，來確立我們的結果。

總體而言，我們的結果建議著，抽菸者的 miR-29b 表現減少可能會增加 DNMT3B mRNA 表現，進而導致肺癌的發生。

參考文獻

1. Boyle P. Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. *Lung Cancer*. 12:167-81, 1995.

2. Hoffmann D. Djordjevic MV. Hoffmann I. The changing cigarette. *Prev Med.* 26:427-34, 1997.
3. Church DF. Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* 64:111-26, 1985.
4. Pryor WA. Prier DG. Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect.* 47:345-55, 1983.
5. Pryor WA. Hales BJ. Premovic PI. et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science.* 220:425-7, 1983.
6. Balentine DA. Wiseman SA. Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:693-704, 1997.
7. Yang CS. Wang ZY. Tea and cancer. *Natl Cancer Inst.* 85:1038-49, 1993.
8. Vayalil PK. Elmets CA. Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis.* 24:927-36, 2003.
9. Yang GY. Liao J. Li C. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis.* 21:2035-9, 2000.
10. Yang GY. Liao J. Kim K. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 19:611-6, 1998.
11. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 358:1148-59, 2008.
12. Jones PA. Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 3:415-28, 2002.

13. Jones PA. Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 293:1068-70, 2001.
14. Taby R. Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*. 60:376-92, 2010.
15. Tang M. Xu W. Wang Q. et al. Potential of DNMT and its epigenetic regulation for Lung Cancer Therapy. *Curr Genomics*. 10:336-52, 2009.
16. Clark SJ. Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*. 21:5380-7, 2002.
17. Saito Y. Kanai Y. Nakagawa T. et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer*. 105:527-32, 2003.
18. Fang MZ. Wang Y. Ai N. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*. 63:7563-70, 2003.
19. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-97, 2004.
20. Filipowicz W. Bhattacharyya SN. Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 9:102-14, 2008.
21. Fabbri M. Garzon R. Cimmiion A. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:15805-10, 2007.
22. Chen KC. Wang YS. Hu CY. et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular disease. *FASEB J*. 25:1718-28, 2011.

23. Milenkovic D. Deval C. Gouranton E. et al. Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One*. 7:e29837, 2012.
24. Anonymous. *Histological typing of lung tumors* (2nd ed.). World Health Organization, Geneva, 1981.
25. Tsubono Y. Nishino Y. Komatsu S. et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med*. 344:632-6, 2001.
26. Jian L. Binns CW. Lee AH. Validity of a food-frequency questionnaire for elderly men in southeast China. *Public Health Nutr*. 9:928-33, 2006.
27. Ogawa K. Tsubono Y. Nishino Y. et al. Validation of a food-frequency questionnaire for cohort studies in rural Japan. *Public Health Nutr*. 6:147-57, 2003.
28. Shen J. Xu L. Owonikoko TK. et al. NNK promotes migration and invasion of lung cancer cells through activation of c-Src/PKC α /FAK loop. *Cancer Lett*. 318:106-13, 2012.
29. Rothschild SI. Tschan MP. Federzoni EA. et al. MicroRNA-29b is involved in the Src-ID1 signaling pathway and is dysregulated in human lung adenocarcinoma. *Oncogene*. 31:4221-32, 2012.
30. Tong X. O'Kelly J. Xie D. et al. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. *Oncogene*. 23:4847-55, 2004.
31. Lin RK. Hsieh YS. Lin P. et al. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *J Clin Invest*. 120:521-32, 2010.

32. Wiseman SA. Balentine DA. Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:705-18, 1997.
33. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220:262-6, 1999.
34. Ahmad N. Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev.* 57:78-83, 1999.
35. Seow A. Poh WT. The M. et al. Fumes from meat cooking and lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:1215-21, 2000.

表一：肺癌病例與對照之人口學特徵

變項	病例 N = 71	對照 N = 71	OR (95% C.I.) ^a
性別			
女	28 (39.4%)	28 (39.4%)	1.00
男	43 (60.6%)	43 (60.6%)	1.00 (0.51-1.96)
年齡 (歲, 平均 ± 標準差)	63.6 ± 14.0	52.6 ± 11.4 ^{**}	
≤ 50	10 (14.1%)	32 (45.1%)	1.00
51-59	21 (29.6%)	20 (28.2%)	3.36 (1.32-8.58) [*]
≥ 60	40 (56.3%)	19 (26.7%)	6.74 (2.75-16.50) ^{**}
抽菸狀況			
無	35 (49.3%)	46 (64.8%)	1.00
有	36 (50.7%)	25 (35.2%)	1.89 (0.96-3.71)
抽菸包年			
0	35 (49.3%)	46 (64.8%)	1.00
1-39	17 (23.9%)	19 (26.8%)	1.18 (0.54-2.59)
≥ 40	19 (26.8%)	6 (8.4%)	4.16 (1.50-11.52) ^{**}
飲用綠茶 (杯/天)			
≥ 1	13 (18.3%)	18 (25.3%)	1.00
< 1	21 (29.6%)	22 (31.0%)	1.32 (0.52-3.35)
0	37 (52.1%)	31 (43.7%)	1.65 (0.70-3.89)
飲用綠茶年數 (年)			
> 10	21 (29.6%)	20 (28.2%)	1.00
≤ 10	13 (18.3%)	20 (28.2%)	0.62 (0.25-1.57)
0	37 (52.1%)	31 (43.6%)	1.14 (0.52-2.47)
蔬果攝取 (餐/週)			
≥ 21	31 (43.6%)	29 (40.9%)	1.00
15-20	19 (26.8%)	19 (26.7%)	0.94 (0.42-2.12)
≤ 14	21 (29.6%)	23 (32.4%)	0.85 (0.39-1.86)
炒菜油煙 (時/週)			
< 1	66 (93.0%)	64 (90.1%)	1.00
1-3	1 (1.4%)	5 (7.0%)	0.19 (0.02-1.71)
≥ 3	4 (5.6%)	2 (2.8%)	1.94 (0.34-10.96)
肺癌家族史			
無	62 (87.3%)	66 (93.0%)	1.00
有	9 (12.7%)	5 (7.0%)	1.52 (0.89-2.59)
病理型態			
腺癌	52 (73.0%)		
鱗狀細胞癌	14 (19.7%)		
其他 ^b	5 (7.0%)		

^a以邏輯斯迴歸模式計算。

^b其他包括小細胞癌 (n = 1) 與未分類 (n = 4)。

*P < 0.01, **P < 0.001。

表二：miR-29b 表現量在肺癌病例與對照的人口學變項之間的分佈

變項	病例		對照		P值 ^a
	N	中位數 (最小值-最大值)	N	中位數 (最小值-最大值)	
全部	71	62 (0.4-1317.0)	71	95 (0.01-15100.0)	0.104
性別					
女	28	43 (0.4-409.9)	28	87 (5.2-15100.0)	0.091
男	43	65 (0.6-1317.0)	43	102 (0.01-6400.0)	0.437
年齡					
≤ 50	10	46 (0.4-241.0)	32	193 (3.1-6400.0)	0.028
51-59	21	51 (0.9-1032.0)	20	39 (0.01-768.0)	0.382
≥ 60	40	67 (0.6-1317.0)	19	102 (6.1-15100.0)	0.295
抽菸狀況					
無	35	42 (0.4-409.0)	46	128 (6.1-15100.0)	0.003**
有	36	67 (3.7-1317.0)	25	42 (0.01-6400.0)	0.268
抽菸包年					
0	35	42 (0.4-409.0)	46	128 (6.1-15100.0)	0.003**
1-39	17	51 (3.8-558.0)	19	42 (0.01-6400.0)	0.680
≥ 40	19	83 (3.7-1317.0)	6	59 (3.1-182.0)	0.239
飲用綠茶 (杯/天)					
≥ 1	13	65 (3.7-1317.0)	18	97 (0.01-794.0)	0.484
< 1	21	62 (1.0-402.0)	22	78 (3.1-6400.0)	0.489
0	37	51 (0.4-1032.0)	31	114 (11.9-15100.0)	0.209
飲用綠茶年數 (年)					
> 10	21	65 (1.0-1317.0)	20	87 (3.1-6400.0)	0.611
≤ 10	13	45 (9.7-402.0)	20	89 (0.01-794.0)	0.311
0	37	51 (0.4-1032.0)	31	114 (11.9-15100.0)	0.209
蔬果攝取 (餐/週)					
≥ 21	31	65 (0.6-1317.0)	29	172 (3.1-2793.0)	0.274
15-20	19	49 (0.4-478.0)	19	91 (0.01-6400.0)	0.170
≤ 14	21	62 (3.8-1032.0)	23	83 (14.9-15100.0)	0.638
炒菜油煙 (時/週)					
< 1	66	63 (0.4-1317.0)	64	90 (0.01-15100.0)	0.195
1-3	1	35 (35.1-35.1)	5	260 (16.8-794.0)	0.558
≥ 3	4	78 (29.0-218.5)	2	128 (118.7-137.0)	0.817
肺癌家族史					
無	62	65 (0.4-1317.0)	66	103 (0.01-15100.0)	0.153
有	9	43 (0.6-155.6)	5	37 (13.3-571.0)	1.000
病理型態					
腺癌	52	67 (0.4-1317.0)	71	96 (0.01-15100.0)	0.337
鱗狀細胞癌	14	46 (1.0-560.8)	71	96 (0.01-15100.0)	0.085
其他 ^b	5	42 (3.99-276.5)	71	96 (0.01-15100.0)	0.173

^a Wilcoxon rank-sum test 或 Kruskal-Wallis test。

^b 其他包括小細胞癌 (n = 1) 與未分類 (n = 4)。

表三：DNMT3B mRNA 表現量在肺癌病例與對照的人口學變項之間的分佈

變項	病例		對照		P值 ^a
	N	中位數 (最小值-最大值)	N	中位數 (最小值-最大值)	
全部	71	35 (0.4-920.0)	71	30 (0.01-1972.0)	0.625
性別					
女	28	24 (1.9-210.0)	28	29 (1.3-693.0)	0.329
男	43	36 (0.4-920.0)	43	27 (0.01-1972.0)	0.304
年齡					
≤ 50	10	22 (4.8-60.9)	32	34 (3.4-819.0)	0.095
51-59	21	25 (2.6-920.0)	20	27 (1.3-165.0)	0.457
≥ 60	40	37 (0.4-544.0)	19	21 (0.01-1972.0)	0.151
抽菸狀況					
無	35	23 (0.4-210.0)	46	29 (0.01-1972.0)	0.437
有	36	41 (2.6-920.0)	25	27 (12.3-819.0)	0.391
抽菸包年					
0	35	23 (0.4-210.0)	46	29 (0.01-1972.0)	0.437
1-39	17	69 (10.0-920.0)	19	31 (12.9-819.0)	0.066
≥ 40	19	25 (2.6-532.0)	6	20 (12.3-144.0)	1.000
飲用綠茶 (杯/天)					
≥ 1	13	24 (10.1-197.0)	18	24 (0.01-440.0)	0.920
< 1	21	24 (0.4-205.0)	22	33 (3.4-1972.0)	0.112
0	37	51 (1.9-920.0)	31	28 (1.3-693.0)	0.052
飲用綠茶年數 (年)					
> 10	21	20 (0.4-197.0)	20	28 (0.01-1972.0)	0.246
≤ 10	13	24 (1.9-205.0)	20	29 (3.4-440.0)	0.672
0	37	51 (1.9-920.0)	31	28 (1.3-693.0)	0.052
蔬果攝取 (餐/週)					
≥ 21	31	29 (1.9-544.0)	29	28 (0.01-1972.0)	0.882
15-20	19	27 (0.4-137.0)	19	28 (3.4-819.0)	0.579
≤ 14	21	35 (1.9-920.0)	23	31 (1.3-164.0)	0.301
炒菜油煙 (時/週)					
< 1	66	29 (0.4-920.0)	64	30 (0.01-1972.0)	0.961
1-3	1	13 (13.5-13.5)	5	22 (1.3-95.0)	0.558
≥ 3	4	47 (10.0-910.0)	2	23 (10.8-35.0)	0.817
肺癌家族史					
無	62	35 (0.4-920.0)	66	30 (1.3-1972.0)	0.740
有	9	21 (1.9-87.0)	5	10 (0.01-31.0)	0.286
病理型態					
腺癌	52	26 (1.9-920.0)	71	28 (0.01-1972.0)	0.872
鱗狀細胞癌	14	43 (0.4-910.0)	71	28 (0.01-1972.0)	0.225
其他 ^b	5	36 (11.1-122.0)	71	28 (0.01-1972.0)	0.722

^a Wilcoxon rank-sum test 或 Kruskal-Wallis test。

^b 其他包括小細胞癌 (n = 1) 與未分類 (n = 4)。

表四：miR-29b 與 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生之合併效應

變項	病例 (N = 71)	對照 (N = 71)	OR (95% C.I.)	P值 ^a	OR (95% C.I.)	P值 ^a
miR-29b/DNMT3B mRNA						
miR-29b 低度表現/DNMT3B 高度表現 ^b	22 (31.0%)	11 (15.5%)	4.07 (0.82-20.26)	0.086	3.36 (1.11-10.17)	0.032
miR-29b 高度表現/DNMT3B 高度表現	6 (8.5%)	7 (10.0%)	4.11 (0.60-28.08)	0.149		
miR-29b 低度表現/DNMT3B 低度表現	40 (56.3%)	42 (59.0%)	2.45 (0.57-10.59)	0.231		
miR-29b 高度表現/DNMT3B 低度表現	3 (4.2%)	11 (15.5%)	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
交互作用檢定	$\chi^2 = 0.707$ (1 df); P = 0.400					
P for trend = 0.289						

^a以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、與抽菸狀況之效應。

^b以對照組其 miR-29b 與 DNMT3B mRNA 之表現依第三分位數來區分為高度與低度表現兩組，miR-29b 與 DNMT3B mRNA 的表現量是分別以 RNU6B 與 GAPDH 當作內部對照。

表五：抽菸狀況分別與 miR-29b 以及 DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用

變項	病例 (N = 71)	對照 (N = 71)	OR (95% C.I.)	P值 ^a
抽菸狀況/miR-29b				
抽菸者/miR-29b 低度表現	29 (40.8%)	21 (29.6%)	9.17 (1.52-55.34)	0.016
抽菸者/miR-29b 高度表現	7 (9.9%)	4 (5.6%)	12.10 (1.42-102.82)	0.023
無抽菸者/miR-29b 低度表現	33 (46.5%)	32 (45.1%)	3.28 (0.59-18.24)	0.176
無抽菸者/miR-29b 高度表現	2 (2.8%)	14 (19.7%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		$\chi^2 = 4.94$ (1 df); P = 0.026		
P for trend = 0.015				
抽菸狀況/DNMT3B mRNA				
抽菸者/DNMT3B mRNA 高度表現	18 (25.4%)	6 (8.5%)	8.09 (2.17-30.11)	0.002
抽菸者/DNMT3B mRNA 低度表現	18 (25.4%)	19 (26.7%)	2.54 (0.88-7.37)	0.086
無抽菸者/DNMT3B mRNA 高度表現	10 (14.0%)	12 (16.9%)	1.06 (0.32-3.52)	0.924
無抽菸者/DNMT3B mRNA 低度表現	25 (35.2%)	34 (47.9%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		$\chi^2 = 5.673$ (1 df); P = 0.017		
P for trend = 0.193				

^a 以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別與年齡之效應。

表六：綠茶飲用分別與 miR-29b、DNMT3B mRNA 表現對於肺癌發生危險之交互作用

變項	病例 (N = 71)	對照 (N = 71)	OR (95% C.I.)	P值 ^a
綠茶飲用/miR-29b				
未飲茶者/miR-29b 低度表現	32 (45.1%)	23 (32.4%)	2.05 (0.61-6.86)	0.245
未飲茶者/miR-29b 高度表現	5 (7.0%)	8 (11.3%)	1.03 (0.20-5.21)	0.971
飲茶者/miR-29b 低度表現	30 (42.3%)	30 (42.3%)	1.82 (0.57-5.79)	0.312
飲茶者/miR-29b 高度表現	4 (5.6%)	10 (14.0%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		$\chi^2 = 0.321$ (1 df); P = 0.571		
P for trend = 0.100				
綠茶飲用/DNMT3B mRNA				
未飲茶者/DNMT3B mRNA 高度表現	19 (26.8%)	4 (5.6%)	3.71 (0.93-14.82)	0.064
未飲茶者/DNMT3B mRNA 低度表現	18 (25.4%)	27 (38.1%)	0.52 (0.21-1.29)	0.157
飲茶者/DNMT3B mRNA 高度表現	9 (12.6%)	14 (19.7%)	0.72 (0.24-2.19)	0.561
飲茶者/DNMT3B mRNA 低度表現	25 (35.2%)	26 (36.6%)	1.00 (reference)	
交互作用檢定		$\chi^2 = 6.465$ (1 df); P = 0.011		
P for trend = 0.098				

^a 以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、與抽菸狀況之效應。

第三章 抽菸、綠茶飲用以及 BIM 基因多形性對於肺癌發生之效應

前言

肺癌是世界各地的主要癌症之一，全球在2012年共有1,820,000個新病例（佔總數的12.9%）和1,600,000人死亡（佔癌症死亡數的19.5%）[1]。在台灣人中，自從1982年起肺癌已經是癌症相關死亡率的首要成因 [2]。肺癌與抽菸和環境二手菸之穩定相關已經被廣泛地建立，並且預估戒菸可預防超過90%以上的肺癌 [3]。實際上，香煙是一種包含數千種化合物的複雜混合物，其中很多是已知或者是疑似人類致癌物 [4, 5]。香煙的焦油 (tar) 部分已經被顯示是苯醌 (quinone)/對苯二酚 (hydroquinone) 氧化還原反應的複雜混合物 [5-7]，具有催化產生過氧化陰離子的能力。氣態煙則包含穩定濃度的游離基，可導致氮氧化物對於在煙流中之低分子量碳氫化合物引動自發性氧化反應 [6]。因此，氧化物/抗氧化物間的不平衡可能在個人暴露於香煙之肺癌致癌機制上具有一定的角色。

表觀遺傳 (epigenetic) 為核酸序列並未改變，但卻改變了基因的表現型態 [8]。DNA 高度甲基化 (hypermethylation) 是表觀遺傳機制對於許多基因默化 (silencing) 的主要關鍵，包括相關於細胞週期的調節 (cell cycle regulation)、接受體 (receptors)、DNA 修復 (DNA repair) 與細胞凋零的基因 [9, 10]。香菸成分中的重要致癌物 N-nitrosodiethylamine 和 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 已經被建議可以引起 DNA 甲基化，因而導致若干癌症的發生，包括肺癌 [11]。在基因啟動子區域上的 DNA 序列發生了甲基化修飾作用，尤其是在 CpG 相連的核酸序列，主要是利用 S-adenosyl-methionine (SAM) 做為甲基的提供者，再以 DNA 甲基轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMT]) 當作催化

劑；DNA 甲基轉移酶利用半胱氨酸 (cysteine) 與 DNA 鹼基胞嘧啶 (cytosine) 上第六個碳結合，造成鄰近第五個碳吸引 SAM 上的甲基結合以形成 5'-methylcytosine [12]。而 NNK 可以透過 AKT 路徑而減弱 β TrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3 β / β TrCP 蛋白降解體路徑去活化；並且也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，並將 β TrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，而在細胞核中大量累積，進而使腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的啟動子高度甲基化，並造成基因默化，進而可能導致肺癌的發生 [11]。

茶已經受到極大地關注，因為茶多酚 (tea polyphenol) 是種強抗氧化物，並且茶品已經顯示出對抗腫瘤發展的抑制能力 [13, 14]。從實驗研究而來的資訊已經一致地顯示，綠茶可能抑制許多物理性及化學性所引發的癌症 [14]；綠茶也被觀察到可以抑制多種致癌性物質所引發的肺癌腫瘤之形成，包括 NNK [14]。有趣的是，低濃度的茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 對於腫瘤抑制基因 P53 具有向上調控的功能，並且可以誘發細胞分裂停滯與 DNA 修補；而高濃度的 EGCG 則會引起細胞凋亡 (apoptosis) [15]，EGCG 在人類大腸癌細胞株中也顯著地具有抗增生的效應 [16]。重要的是，EGCG 在不同癌症細胞株中都能抑制 DNA 甲基轉移酶的表現，包括肺癌 [17, 18]。

人類的細胞死亡之 BCL-2 調節者 (BCL-2 interacting mediator of cell death [BIM]) 基因位於染色體 2q12-q13 的位置，此腫瘤抑制基因是 BCL 家族成員之一 [19]；其所製造出的產物只含有 BCL-2 同源結構區域 3 (BCL-2 homology domain 3 [BH3])，能夠與抑制凋亡蛋白 BCL-2 結合，進而促進細胞凋亡作用 [20-22]。在非小細胞肺癌中，BCL-2 引導的上皮細胞生長因子接受體 (epidermal

growth factor receptor [EGFR]) 基因突變能夠活化 P13K/AKT/mTORC 和 MER/ERT 的訊息傳遞，決定細胞存活與凋亡，並且 BIM 基因的 BH3 區域缺失則會導致細胞凋亡功能受阻 [23]。在慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia) 與非小細胞肺癌細胞株中，BIM 基因多形性為可賦予酪氨酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitors [TKI]) 抗性，但此抗性可透過 BH3 藥物加以克服；然而，在 BIM 基因多形性缺失的病患中，其 BIM 基因所轉譯出的 BH3 蛋白則出現截斷現象，此現象導致病患具有較差的存活與對於藥物產生抗性 [24]。在先前的細胞株實驗中也發現，BIM 可以受到 DNA 甲基轉移酶之高度甲基化而靜默其表現；然而，給予組織蛋白去乙酰化酶抑制劑 A (histone deacetylase inhibitor trichostatin A) 即可恢復組織蛋白乙酰化酶，並且能夠上調 BIM 表現與誘導細胞凋亡 [25]。在先前的研究中，58 名非小細胞肺癌病人被發現有 43% 具有 BIM 高度表現，並且與抽菸狀態、腫瘤型態以及分化具有相關 [26]。BIM 大量表現於細胞膜與細胞質中，在膠原蛋白誘發之大鼠關節炎 (collagen-induced arthritis [CIA]) 中發現 BIM 蛋白表現較低；然而，經由 EGCG 處理的 CIA 大鼠則發現 BIM 蛋白表現顯著增加，如此的結果可能反映著綠茶中的 EGCG 能夠透過 P13K/AKT/mTORC 的訊息路徑來促使細胞凋亡 [27]。

目前，對於 BIM 基因的探討主要著眼在酪氨酸激酶抑制劑的使用和病人的存活；但是，並沒有 BIM 基因多形性對於肺癌發生危險性的相關研究。因此，我們有興趣去探討抽菸、綠茶飲用以及 BIM 基因多形性對於肺癌發生危險的效應。

材料與方法

研究對象

本計畫是審核通過後始執行的。總計，共有245位原發性肺癌（國際疾病分類第10版，ICD10代碼C33-C34）病患從台中中山醫學大學附設醫院、澄清醫院、以及童綜合醫院被納入至本研究中，全部病例也由合格的病理學家執行一系列的病理階段檢查；腫瘤的類型和階段也依據世界衛生組織（World Health Organization [WHO]）的分類方式來決定 [28]。同時，490位潛在的對照是從不具癌症病史的病患中隨機選取；他們是在相同的教學醫院執行身體檢查。在本研究中，採用1：2之病例與對照的配對比例；對照個別地與病例的年齡（±5歲）及性別進行配對。

流行病學資料

所有參與者的同意書皆被獲取。結構式問卷所涵蓋的問題包括：人口學特質、生活型態如抽菸習慣、綠茶飲用、食用水果和蔬菜，實際烹煮情形以及肺癌家族史。研究對象的抽菸史包括每天抽菸的支數和抽菸年數；累積抽菸量是以抽菸包年計算，亦即每天的包數乘以抽菸的年數。水果及蔬菜的攝取也從當地普遍可獲得並且一般被攝取的種類中，計算出最近三年前的每週標準化平均餐數。肺癌家族史，則是定義為研究對象之一等親親屬具有肺癌。此外，過去家戶的烹飪暴露也被評估；而烹飪的暴露，研究對象被詢問關於各種烹飪方法的使用頻率，特別是他們平常的炒菜方式。

在台灣，茶壺裝盛每批茶葉的乾重約為3-5克，再倒入熱水沖泡（約150-250毫升），並且不加入任何的糖或牛奶等添加物，從茶壺沖泡出來的茶再倒入茶杯中飲用。通常沖泡的第一泡茶液會快速地被倒出不飲，第二泡約浸泡2-3分鐘後

倒出，第三、四泡則約浸泡5分鐘後倒出飲用；同一批茶葉大約會回沖3-4次。在台灣用來飲用綠茶的茶杯體積較小 (30-50毫升)，故在面訪時依研究對象所描述之飲茶量轉換成標準容器的體積量 (100-120毫升)。在我們的研究中，關於綠茶飲用的調查分為幾個回應做為分類。首先研究對象會被詢問是否有飲用綠茶，回應為“曾經飲用綠茶者”則進一步地被詢問飲用綠茶量以及飲用綠茶年數。綠茶飲用的頻率則是從五個可能得到的答覆去評估，即每天一杯以上、一週三到四杯、一週一到二杯、一個月一到二杯或更少；接續詢問習慣飲用綠茶的年數。對於每天飲用綠茶者，每天所飲用的杯數被進一步地確認。我們也針對問題的答覆，根據先前的一項追蹤研究，區分成五項類別：每天少於一杯、每天一至二杯、每天三至四杯、每天五至九杯、每天十杯以上 [29]。為了避免個人在疾病診斷後改變其飲茶習慣而造成對於飲用綠茶的錯誤分組 (misclassification)，我們僅收集在疾病發生前的累積量。在本研究中，綠茶飲用是根據一項先前的研究來評估的 [33]，該研究使用問卷以及根據一年內三天的飲食紀錄來評估綠茶飲用量，兩者間的斯皮爾曼相關係數 (Spearman's correlation coefficient) 為0.66；並且藉由兩份問卷評估相隔六個月前後之綠茶飲用量，兩者之間的斯皮爾曼相關係數也為0.66。以相似的問卷來評估綠茶飲用也在其他的研究中被運用 [30, 31]，這意味著此評估方法具有一定的效度。

BIM 基因多形性

所有研究對象之靜脈血被收集在含有抗凝血劑 (heparin) 的採血管中，並且被分離成為血漿、buffy coat和紅血球。這些樣本在同一天內被處理並儲存於-70°C下，基因型的測定是從buffy coat萃取出DNA來進行。

根據Zhao等人 [20] 的研究，BIM基因型是執行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR]) 增幅來辨識BIM基因型的缺失，用以增幅BIM基因的引發子 (primers)，分別為5'-CCA CCA ATG GAA AAG GTT CA-3'、5'-CTG TCA TTT CTC CCC ACC AC-3'、以及5'-GGC ACA GCC TCT ATG GAG AA-3'。0.5 μ l的DNA被加至包含200 ng的引發子、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM的dNTPs、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 和0.1%的BSA的PCR緩衝劑中，最後總體積調整為50 μ l。PCR循環參數組成為95°C下五分鐘之先前培養，接續於95°C下30秒之變性步驟、61°C下30秒之黏合、以及72°C下30秒之延展，共35回合循環，反應於最後的25°C十分鐘之延展後終止，PCR產物在3%瓊膠中以ethidium bromide染色後判讀，同型的BIM缺失基因型個體表現出285 bp一段產物片段，同型的BIM野生型個體表現出363 bp一段產物片段，而異型的BIM基因型者則有363 bp和285 bp二段產物片段。

統計方法

對於病例組與對照組的性別、收案時之年齡、抽菸狀況、抽菸包年、綠茶飲用、蔬菜與水果的攝取量、過往烹煮的暴露、與肺癌家族史之比較，若是連續性變項以Student's *t*-test檢定；若是類別性變項則以 χ^2 -test檢定。 χ^2 -test也被執行以檢定在病例組與對照組中BIM基因型的盛行率差異，並且以Goodness-of-fit χ^2 -test檢驗基因型是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。隨後，使用邏輯斯迴歸模式 (logistic regression model) 求取每個變項的調整後危險對比值 (adjusted odds ratio [OR]) 以及95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.])。另外，likelihood ratio χ^2 -tests將被執行以檢定抽菸、綠茶飲用狀態分別與基因型對

於肺癌發生危險性的交互作用；在交互作用的檢定中，將僅納入兩個主效應項的邏輯斯迴歸模式與同時納入兩個主效應項和交互作用項的模式進行比較，交互作用效應是定義為兩項模式的偏差 (deviance) 之差異。所有的P值皆以雙尾檢定來計算，全部數據以SAS 9.4分析。

結果

總計，共有735名研究對象 (441名男性與294名女性) 參與本研究，年齡範圍從29歲至93歲，其特徵整理於表一。在組織學確認為原發性肺癌之245名病例中，155名 (63.3%) 為肺腺癌以及53名 (21.6%) 為鱗狀細胞癌。在研究對象中，男性所佔比例為60%，女性為40%；肺癌病患的平均年齡為65.3歲，對照為64.2歲。如同我們所預期的，相較於對照，肺癌病例中具有較多抽菸者 (54.3% vs. 31.4%；OR = 2.59；95% C.I. = 1.89-3.55)；34.3%的病例抽菸超過40包年，而在對照中此數值是16.1% (OR = 3.20；95% C.I. = 2.20-4.65)。在飲用綠茶的部分，肺癌病例相較於對照有較高比率之未飲用綠茶者 (75.1% vs. 64.5%)；在飲用綠茶的時間上，病例組也僅有12.2%超過十年，相較於對照組的比率 (17.8%) 是具有顯著的差異。此外，病例組與對照組在蔬果攝取頻率上呈現顯著的差異，病例組相較於對照組也具有顯著較高比例的炒菜油煙暴露以及肺癌家族史。

研究對象之 BIM 基因型的盛行率，顯示在表二。在病例組中，BIM 的-與+對偶基因頻率分別是9.0%以及91.0%，而對照組的-與+對偶基因頻率分別是7.7%以及92.4%；基因型者的頻率分佈在病例組與對照組之間並沒有顯著差異 (OR = 1.19；95% C.I. = 0.81-1.76)。

隨後，我們將 BIM 基因型進行分組，並且分析抽菸狀況以及抽菸包年對於

肺癌發生危險之相關 (表三)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、蔬果攝取、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 BIM ++基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 BIM ++基因型之抽菸者具有6.81倍 (95% C.I. = 4.03-11.50) 的肺癌發生危險；並且，抽菸狀況與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性具有邊緣顯著的交互作用存在 ($P = 0.08$)。我們也以0、1-39、以及大於40包年之累積抽菸量分層來加以評估，同樣地選取攜帶 BIM ++基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 BIM ++基因型之抽菸包年為1-39包年 (OR = 5.17, 95% C.I. = 2.81-9.49)、以及攜帶 BIM ++基因型之抽菸包年為大於40包年者 (OR = 8.46, 95% C.I. = 4.74-15.13) 分別具有顯著較高的肺癌發生危險性。而以攜帶 BIM +/-與-/-基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 BIM +/-與-/-基因型且抽菸包年大於40包年者 (OR = 3.78, 95% C.I. = 1.05-13.64) 具有顯著較高的肺癌發生危險性。然而，累積抽菸量與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性並未具有顯著的交互作用存在 ($P = 0.17$)。

接續，我們在不同的抽菸狀況分組中評估綠茶飲用與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表四)。在調整性別、年齡、蔬果攝取、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 BIM ++基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 BIM ++基因型之未飲用綠茶者具有1.86倍 (95% C.I. = 1.21-2.86) 的肺癌發生危險；同樣地，相較於攜帶 BIM +/-與-/-基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 BIM +/-與-/-基因型之未飲用綠茶者呈現出2.34倍 (95% C.I. = 0.92-5.95) 的肺癌發生危險，然而差距並未達到統計顯著性。當選取攜帶 BIM ++基因型之綠茶飲用年數大於10年者做為參考組 (OR = 1.00) 時，則攜帶 BIM ++基因型且綠茶飲用年數小於10年者具有1.91倍 (95% C.I. = 1.10-3.32) 的肺癌發生危險；當攜帶

BIM +/-與-/-基因型之綠茶飲用年數大於10年者做為參考組 (OR = 1.00) 時，則攜帶 BIM +/-與-/-基因型且綠茶飲用年數小於10年者具有2.96倍 (95% C.I. = 1.00-8.84) 的肺癌發生危險。然而，在全體研究對象之中，綠茶飲用與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性並未呈現顯著的交互作用存在。

進一步地，我們將研究對象以其抽菸狀況進行分組。在抽菸者之中，分別相較於攜帶 BIM ++基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00) 以及攜帶 BIM +/-與-/-基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 BIM ++基因型之未飲用綠茶者 (OR = 1.55，95% C.I. = 0.88-2.72) 以及攜帶 BIM +/-與-/-基因型之未飲用綠茶者 (OR = 3.65，95% C.I. = 0.84-15.84) 皆未呈現出顯著較高的肺癌發生危險。同樣在抽菸者之中，分別相較於攜帶 BIM ++基因型之綠茶飲用年數大於10年者 (OR = 1.00) 以及攜帶 BIM +/-與-/-基因型之綠茶飲用年數大於10年者 (OR = 1.00)，則攜帶 BIM ++基因型之綠茶飲用年數小於10年者並未展現出顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 1.67，95% C.I. = 0.87-3.24)，而攜帶 BIM +/-與-/-基因型之綠茶飲用年數小於10年者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 12.54，95% C.I. = 1.35-116.67)。特別的是，在抽菸者之中，綠茶飲用與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性呈現邊緣顯著的交互作用存在 ($P = 0.06$)。

在非抽菸者之中，攜帶BIM ++基因型之未飲用綠茶者相較於攜帶BIM ++基因型之飲用綠茶者具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 2.43，95% C.I. = 1.20-4.90)。然而，攜帶BIM +/-與-/-基因型之未飲用綠茶者相較於攜帶BIM +/-與-/-基因型之飲用綠茶者、攜帶BIM ++基因型之綠茶飲用年數小於10年者相較於攜帶BIM ++基因型之綠茶飲用年數大於10年者、以及攜帶BIM +/-與-/-基因型之綠茶飲用年數小於10年者相較於攜帶BIM +/-與-/-基因型之綠茶飲用年數大於10

年者皆未呈現出顯著較高的肺癌發生危險。

討論

現今的研究觀察到，BIM $-/-$ 基因型者相較於攜帶 $+/+$ 基因型者具有較高的肺癌發生危險，然而結果並未達到統計上的顯著性，可能是因為我們研究對象的樣本數不足，限制了相關的統計檢定力。

香菸成分中的重要致癌物 NNK 已經被建議可以引起 DNA 甲基化，因而導致若干癌症的發生，包括肺癌 [11]。NNK 可以透過 AKT 路徑而減弱 β TrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3 β / β TrCP 蛋白降解體路徑去活化；並且也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，並將 β TrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，而在細胞核中大量累積，進而使抑癌基因的啟動子高度甲基化並造成基因默化 [11]。在先前的細胞株實驗中也發現，BIM 可受到 DNA 甲基轉移酶之高度甲基化而靜默其表現；然而，給予組織蛋白去乙酰化酶抑制劑 A (histone deacetylase inhibitor trichostatin A) 即可恢復組織蛋白乙酰化酶，並且能夠上調 BIM 表現與誘導細胞死亡 [25]。先前的研究中，58 名非小細胞肺癌病人被發現有 43% 具有 BIM 高度表現，並且與抽菸狀態、腫瘤型態以及分化具有相關聯 [26]。有趣的是，我們現今的研究在吸菸者中觀察到攜帶 BIM $+/+$ 基因型者相較於攜帶 BIM $+/-$ 與 $-/-$ 基因型者具有較高的肺癌發生危險性；並且，抽菸包年與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性也具有邊緣的顯著交互作用存在。然而，如此的觀察在未來仍需要進一步的功能性研究來加以確認，例如驗證 NNK 可否透過 AKT 路徑來使 DNA 甲基轉移酶蛋白累積。

許多實驗研究報告顯示，綠茶可能抑制許多由物理性及化學性致癌物所引發

的癌症 [14]；而與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [32, 33]。茶多酚明顯地是種強抗氧化物，並且可以有效地清除自由基，它們也可能預防致突變性和基因毒性，抑制腫瘤的起始、促進、以及細胞增生；調控去毒性酵素，並且清除致癌物的活化代謝產物 [14, 34]。茶多酚也已經被顯示，可抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 [35, 36]。在先前的研究中也發現，BIM 大量表現於細胞膜與細胞質中，在膠原蛋白誘發之大鼠關節炎 (collagen-induced arthritis [CIA]) 中發現 BIM 蛋白表現較低；然而，經由 EGCG 處理的 CIA 大鼠則發現 BIM 蛋白表現顯著增加，如此的結果可能反映著綠茶中的 EGCG 能夠透過 PI3K/AKT/mTORC 的訊息路徑來促使細胞凋亡 [27]。這些證據支持著我們的結果，未飲用綠茶者相較於飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險。特別的是，我們先前的研究也發現 [37]，綠茶飲用與抽菸對於肺癌之發生危險是具有交互作用存在的；未飲用綠茶者較飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險性，而在吸菸者中此效應更為明顯。在本篇研究中並未觀察到綠茶與 BIM 基因型對於肺癌發生危險性具有交互作用，原因可能是因為我們研究對象的樣本數不足，限制了相關的統計檢定力。此外，我們並無法實際評估茶多酚於人體中之生物利用度，也未能評估 BIM 基因的角色。未來的研究應該致力於瞭解 BIM 基因對於綠茶所抑制肺癌相關之 DNA 甲基化的影響，並且評估綠茶飲用對於其他 DNMT 甲基化表現與肺癌發生關係之影響。

許多人類的觀察研究建議蔬果的攝取對於肺癌的預防是有益的，大部分的證據傾向於蔬果攝取與肺癌危險呈現反向關係；但是在一項西班牙的病例對照研究中，並沒有發現蔬果攝取對於肺癌具有保護效應 [38]。我們的結果也顯示，蔬果攝取與肺癌危險並沒有一致性的結果。可能的原因是利用問卷去估計蔬果攝取

量是無法準確評估實際的攝取量，並且造成估計上的偏差；對於多數研究對象而言，估計特定種類的蔬果攝食頻率是有困難的。蔬果攝取量與肺癌危險之間的關係，仍有待進一步的研究來加以釐清。烹飪油煙的複雜成分中，芳香雜環化胺 (aromatic heterocyclic amines [HCAs]) 是主要的致癌物，並且與肺癌相關 [39]。在我們的研究中，炒菜油煙每週暴露的時間對於肺癌發生危險有一個趨勢關係存在；特別在炒菜油煙每週暴露大於三小時以上者具有較高的肺癌發生危險。另外，我們也去詢問病例以及對照其肺癌家族史，並且病例相較於對照具有較高比例的肺癌家族史。這項結果顯示，肺癌的家族危險性可能是歸因於遺傳因子或是共同的環境因子。

我們的研究中，健康對照的 BIM ++ 基因頻率為 85.5%，是接近於過去華人研究所報告的頻率 (85.3%) [40]；而且我們研究對象之 BIM 基因多形性的頻率也符合哈溫定律，證實著我們基因型技術的可信性和成果。在本研究中，我們的研究對象樣本數較少，因此經過分層分析後，會限制基因型與肺癌發生危險相關判定的檢定力；並且使用問卷詢問綠茶飲用量以及茶品種類的錯誤分類，可能無法準確評估綠茶實際攝取的劑量。因此，未來仍需增加研究對象的樣本數以及設計更有效的研究方法，以更確立我們的結果。

我們的結果建議著，在抽菸者中，BIM ++ 基因型可能增加啟動子的活性，進而造成 DNA 高度甲基化，而導致肺癌的發生。

參考文獻

1. Ferlay J. Soerjomataram I. Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J*

- Cancer. 136:E359-86, 2015.
2. Department of Health, Executive Yuan, Republic of China (1982-2008). Health statistics, vol. II. Vital statistics 1981-2007. Taipei: Department of Health.
 3. Boyle P. Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. Lung Cancer. 12:167-81, 1995.
 4. HoffmannD. Djordjevic MV. HoffmannI. The changing cigarette. Prev Med. 26:427-34, 1997.
 5. Church DF. PryorWA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect. 64:111-26, 1985.
 6. PryorWA. Prier DG. Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. Environ Health Perspect. 47:345-55, 1983.
 7. PryorWA. Hales BJ. Premovic PI. et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. Science. 220:425-7, 1983.
 8. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 358:1148-59, 2008.
 9. Jones PA. Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 3:415-28, 2002.
 10. Jones PA. Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science. 293:1068-70, 2001.
 11. Lin RK. Hsieh YS. Lin P. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. J Clin Invest. 120(2):521-32, 2010.
 12. Taby R. Issa JP. Cancer epigenetics. CA Cancer J Clin. 60:376-92, 2010.
 13. BalentineDA. Wiseman SA. Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. Crit Rev Food SciNutr. 37:693-704, 1997.

14. Yang CS. Wang ZY. Tea and cancer. *Natl Cancer Inst.* 85:1038-49, 1993.
15. Zou C. Liu H. Feugang JM. et al. Green tea compound in chemoprevention of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 20:617-24, 2010.
16. Du GJ. Wang CZ. Qi LW. et al. The synergistic apoptotic Interaction of panaxadiol and epigallocatechingallate in human colorectal cancer cells. *Phytother Res.* 27:272-7, 2013.
17. Tang M. Xu W. Wang Q. et al. Potential of DNMT and its epigenetic regulation for lung cancer therapy. *Curr Genomics.* 10:336-52, 2009.
18. Fang MZ. Wang Y. Ai N. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 63:7563-70, 2003.
19. Bouillet P. Zhang LC. Huang DC. et al. Gene structure alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Mamm Genome.* 12:163-8, 2001.
20. Zhao M. Zhang Y. Cai W. et al. The Bim deletion polymorphism clinical profile and its relation with tyrosine kinase inhibitor resistance in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer.* 2299-307, 2014.
21. Herold MJ. Stuchbery R. Mérimo D. Impact of conditional deletion of the pro-apoptotic BCL-2 family member BIM in mice. *Cell Death Dis.* 5:e1446, 2014.
22. Isobe K. Hata Y. Tochigi N. Clinical significance of BIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation. *J Thorac Oncol.* 9(4):483-7, 2014.
23. Faber AC. Ebi H. Costa C. et al. Apoptosis in targeted therapy responses: the role of BIM. *Adv Pharmacol.* 65:519-42, 2012.

24. Ng KP. Hillmer AM. Chuah CT. et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med.* 18:521-8, 2012.
25. Piazza R. Magistroni V. Mogavero A. et al. Epigenetic silencing of the proapoptotic gene BIM in anaplastic large cell lymphoma through an MeCP2/SIN3a deacetylating complex. *Neoplasia.* 15:511-22, 2013.
26. Sakakibara-Konishi J. Oizumi S. Kikuchi J. Expression of Bim, Noxa, and Puma in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 12:286, 2012.
27. Liu D. Li P. Song S. et al. Pro-apoptotic effect of epigallo-catechin-3-gallate on B lymphocytes through regulating BAFF/PI3K/Akt/mTOR signaling in rats with collagen-induced arthritis. *Eur J Pharmacol.* 690:214-25, 2012.
28. Anonymous. *Histological typing of lung tumors (2nd ed.)*. World Health Organization, Geneva, 1981.
29. Tsubono Y. Nishino Y. Komatsu S. et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med.* 344:632-6, 2001.
30. Jian L. Binns CW. Lee AH. Validity of a food-frequency questionnaire for elderly men in southeast China. *Public Health Nutr.* 9:928-33, 2006.
31. Ogawa K. Tsubono Y. Nishino Y. et al. Validation of a food-frequency questionnaire for cohort studies in rural Japan. *Public Health Nutr.* 6:147-57, 2003.
32. Wiseman SA. Balentine DA. Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37(8):705-18, 1997.
33. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220(4):262-6, 1999.

34. Ahmad N. Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev.* 57(3):78-83, 1999.
35. Yang GY. Liao J. Li C. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis.* 21:2035-9, 2000.
36. Yang GY. Liao J. Kim K. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 19:611-6, 1998.
37. Lin IH. Ho ML. Chen HY. et al. Smoking, green tea consumption, genetic polymorphisms in the insulin-like growth factors and lung cancer risk. *PLoS One.* 7(2):e30951, 2012.
38. Ruano-Ravina A. Figueiras A. Dosil-Diaz O. et al. A population-based case-control study on fruit and vegetable intake and lung cancer: a paradox effect? *Nutr Cancer.* 43(1):47-51, 2002.
39. Seow A. Poh WT. Teh M. et al. Fumes from meat cooking and lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(11):1215-21, 2000.
40. Cho EN. Kim EY. Jung JY. et al. BCL2-like 11 intron 2 deletion polymorphism is not associated with non-small cell lung cancer risk and prognosis. *Lung Cancer.* 90(1):106-10, 2015.

表一：肺癌病例與對照之人口學特徵的頻率分佈

變項	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a
	N = 245	N = 490	
性別			
女	94 (38.4%)	200 (40.8%)	1.00
男	151 (61.6%)	290 (59.2%)	1.11 (0.81-1.52)
年齡 (歲, 平均 ± 標準差)	65.3 ± 11.7	64.2 ± 11.6	
≤ 50	28 (11.4%)	57 (11.6%)	1.00
51-59	47 (19.2%)	107 (21.8%)	0.89 (0.51-1.58)
≥ 60	170 (69.4%)	326 (66.5%)	1.06 (0.65-1.73)
抽菸狀況			
無	112 (45.7%)	336 (68.6%)	1.00
有	133 (54.3%)	154 (31.4%)	2.59 (1.89-3.55)**
抽菸包年			
0	112 (45.7%)	337 (68.8%)	1.00
1-39	49 (20.0%)	74 (15.1%)	2.00 (1.31-3.03)**
≥ 40	84 (34.3%)	79 (16.1%)	3.20 (2.20-4.65)**
飲用綠茶 (杯/天)			
≥ 1	20 (8.2%)	102 (20.8%)	1.00
< 1	41 (16.7%)	72 (14.7%)	2.90 (1.57-5.37)**
0	184 (75.1%)	316 (64.5%)	2.97 (1.78-4.96)**
飲用綠茶年數 (年)			
> 10	30 (12.2%)	87 (17.8%)	1.00
≤ 10	31 (12.7%)	87 (17.8%)	1.03 (0.58-1.85)
0	184 (75.1%)	316 (64.4%)	1.69 (1.07-2.66)*
蔬果攝取 (餐/週)			
≥ 21	120 (49.0%)	248 (50.6%)	1.00
15-20	62 (25.3%)	79 (16.1%)	1.62 (1.09-2.42)**
≤ 14	63 (25.7%)	163 (33.3%)	0.80 (0.56-1.15)
炒菜油煙 (時/週)			
< 1	202 (82.5%)	444 (90.6%)	1.00
1-3	22 (9.0%)	26 (5.3%)	1.86 (1.03-3.36)*
≥ 3	21 (8.5%)	20 (4.1%)	2.31 (1.22-4.35)**
肺癌家族史			
無	226 (92.2%)	476 (97.1%)	1.00
有	19 (7.8%)	14 (2.9%)	2.86 (1.41-5.80)**
病理型態			
腺癌	155 (63.3%)		
鱗狀細胞癌	53 (21.6%)		
其他 ^b	37 (15.1%)		

^a以邏輯斯迴歸模式計算。

^b其他包括小細胞癌 (n = 10)、大細胞癌 (n = 1)、混和細胞癌 (n = 5) 與未分類 (n = 21)。

* 0.01 < P < 0.05, ** P < 0.01。

表二：肺癌病例與對照之 BIM 基因型的頻率分佈

變項	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a
	N = 245	N = 490	
BIM			
+/+	201 (82.0%)	419 (85.5%)	1.00
+/-	44 (18.0%)	67 (13.7%)	1.37 (0.90-2.08)
-/-	0 (0.0%)	4 (0.8%)	-
+/+	201 (82.0%)	419 (85.5%)	1.00
+/-與-/-	44 (18.0%)	71 (14.5%)	1.29 (0.86-1.95)
+對偶基因	446 (91.0%)	905 (92.4%)	1.00
-對偶基因	44 (9.0%)	75 (7.7%)	1.19 (0.81-1.76)

^a以邏輯斯迴歸模式計算。

表三：抽菸與 BIM 基因型對於肺癌發生危險之交互作用

變項	BIM ++基因型			BIM +/-與-/-基因型		
	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a	病例	對照	OR (95% C.I.) ^a
抽菸狀況						
非抽菸者	88	290	1.00	24	46	1.00
抽菸者	113	129	6.81 (4.03-11.50)*	20	25	3.15 (0.99-10.07)
交互作用檢定			$\chi^2 = 3.07$ (1 df); P = 0.08			
抽菸包年						
0	88	290	1.00	24	46	1.00
1-39	44	67	5.17 (2.81-9.49)*	5	8	2.25 (0.49-10.36)
≥ 40	69	62	8.46 (4.74-15.13)*	15	17	3.78 (1.05-13.64)*
交互作用檢定			$\chi^2 = 3.58$ (2 df); P = 0.17			

^a以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、綠茶飲用、蔬果攝取、炒菜油煙

暴露和肺癌家族史的效應。

*P = 0.04, **P < 0.01。

表四：在不同的抽菸狀況分組中，綠茶飲用與 BIM 基因型對於肺癌發生危險之交互作用

變項	非抽菸者				抽菸者				全部			
	BIM+/+基因型		BIM+/-與-/-基因型		BIM+/+基因型		BIM+/-與-/-基因型		BIM+/+基因型		BIM+/-與-/-基因型	
	CA/CN	OR	CA/CN	OR	CA/CN	OR	CA/CN	OR	CA/CN	OR	CA/CN	OR
	(95% C.I.)		(95% C.I.)		(95% C.I.)		(95% C.I.)		(95% C.I.)		(95% C.I.)	
飲用綠茶狀況												
飲茶者	14/82	1.00	6/16	1.00	37/65	1.00	4/11	1.00	51/147	1.00	10/27	1.00
未飲茶者	74/208	2.43	18/30	1.85	76/64	1.55	16/14	3.65	150/272	1.86	34/44	2.34
	(1.20-4.90) [*]		(0.50-6.84)		(0.88-2.72)		(0.84-15.84)		(1.21-2.86) ^{**}		(0.92-5.95)	
交互作用檢定	$\chi^2 = 0.20$ (1 df); P = 0.66				$\chi^2 = 0.67$ (1 df); P = 0.42				$\chi^2 = 0.30$ (1 df); P = 0.58			
綠茶飲用年數												
> 10	5/33	1.00	5/10	1.00	19/35	1.00	1/9	1.00	24/68	1.00	6/19	1.00
≤ 10	83/257	2.42	19/36	1.43	94/94	1.67	19/16	12.54	177/351	1.91	38/52	2.96
	(0.86-6.83)		(0.35-5.82)		(0.87-3.24)		(1.35-116.67) [*]		(1.10-3.32) [*]		(1.00-8.84) [*]	
交互作用檢定	$\chi^2 = 0.83$ (1 df); P = 0.36				$\chi^2 = 3.46$ (1 df); P = 0.06				$\chi^2 = 0.42$ (1 df); P = 0.52			

^a 以邏輯斯迴歸模式計算，並且調整性別、年齡、蔬果攝取、炒菜油煙暴露和肺癌家族史的效應。

* 0.01 < P < 0.05, ** P < 0.01。

第四章 抽菸、綠茶飲用與微型核糖核酸-29b 對於 DNA 甲基轉移酶表現、腫瘤抑制基因 (GSTM2 與 BIM) 甲基化以及肺癌發展之效應

前言

肺癌是世界各地的主要癌症，在2012年全球共有1,820,000個新病例（佔總數的12.9%）和1,600,000人死亡（佔癌症死亡數的19.5%）[1]；在台灣中，肺癌自從1982年起也已經是癌症相關死亡率的首要成因 [2]。

肺癌與抽菸和環境二手菸之穩定相關已經被廣泛地建立，並且預估戒菸可以預防超過90%以上的肺癌 [3]。實際上，香菸包含數千種化合物，其中很多是已知或者是疑似人類致癌物 [4]。香菸的焦油 (tar) 部分已經被顯示是苯醌 (quinone)/對苯二酚 (hydroquinone) 氧化還原反應的複雜混合物 [5, 6]，具有催化產生過氧化陰離子的能力；氣態煙則包含穩定濃度的游離基，可導致氮氧化物對於在煙流中之低分子量碳氫化合物引動自發性氧化反應 [5]。亞硝胺 (N-nitrosamines)，例如4-(methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanone (NNK)，是菸草中的生物鹼在固化過程所形成的；其與香菸在燃燒時所產生多環芳香烴 (Polycyclic aromatic hydrocarbons [PAH])，例如benzo[a]pyrene (BaP)，都是香菸中已知最豐富的基因毒性成分 [7]，可以藉由多種機制來參與自腫瘤啟始 (initiation)、促使 (promotion)、以及進展 (progression) 三個致癌階段 [7]。除了產生基因毒性作用外，香菸所產生的非基因毒性對於癌症的發生也被認為是相當重要的，因為香菸成分可以做為改變細胞增殖和細胞死亡的調節者 [8]。然而，香菸成分是否會透過表觀遺傳 (epigenetic) 來進一步影響腫瘤抑制基因的活化，仍須要進一步地被探討。

表觀遺傳是指任何架構在基因層面之上調控基因訊息的分子或機制，這些要素並不會改變基因的序列，而是透過修飾染色質 (chromatin) 結構以及後轉錄 (post-transcription) 過程來控制基因表現、蛋白功能和特性，進而造成細胞或個體的差異 [9]。表觀遺傳修飾，包括DNA甲基化 (DNA methylation)、組織蛋白 (histone) 修飾以及核小體定位 (nucleosome positioning) [10]。DNA高度甲基化 (hypermethylation) 是表觀遺傳機制對於基因默化的主要關鍵，其效應包括影響細胞週期的調節 (cell cycle regulation)、接受體 (receptors)、DNA修復 (DNA repair) 與細胞凋零 (apoptosis) [11, 12]。在基因啟動子區域上的序列產生了甲基化修飾作用，尤其是在CPG相連的核酸序列，主要是利用S-adenosyl-methionine (SAM) 做為甲基的提供者，並以DNA甲基轉移酶 (DNA methyltransferase [DNMT]) 當作催化劑；DNA甲基轉移酶利用半胱氨酸 (cysteine) 與DNA鹼基胞嘧啶 (cytosine) 上第六個碳結合，造成鄰近第五個碳吸引SAM上的甲基結合以形成5' -methylcytosine [13]。在哺乳動物中，啟動子區域的特徵為GC含量比例約為60-70%；因此，在啟動子上的CPG群島發生DNA甲基化以及影響基因表現的機率也較高 [14]。甲基化可以藉由直接抑制蛋白或轉錄因子鍵結至啟動子區域，或是藉由甲基化-CPG結合蛋白貼附至啟動子區域以間接抑制轉錄因子的鍵結，進而抑制基因的表現 [9]。大部分的基因體非編碼區域 (non-coding region) 經常是低度甲基化 (hypomethylation) 的，如此以維持基因處於非活化的狀態 [9]；然而在癌細胞中，則是經常具有腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) 的高度甲基化 [9, 15]。當腫瘤抑制基因受到高度甲基化而靜默其表現，則也促成了細胞惡性轉化 [15]。然而，表觀遺傳是否會受到其他機制所調控，尚欠缺相關的證據。

在哺乳動物中，目前已有五種不同的DNA甲基轉移酶被確認，並且可分為DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B與DNMT3L [16]。DNMT1為決定DNA甲基化的酵素，並且導致基因默化；DNMT2的活性較弱，但是仍具有影響力；DNMT3A與DNMT3B則參與DNA甲基化的重新組合 (de novo methylation)，而DNMT3L雖然不具有催化DNA甲基化的功能，但是能夠將DNMT3A與DNMT3B去活化。在腫瘤中，已經觀察到DNMT1與DNMT3B的活性具有增加的情形 [17-20]。重要的是，香菸重要的成份NNK被觀察到可以透過AKT訊息傳遞來削弱 β TrCP (β -transducin repeat-containing protein) 降解蛋白的能力，進而促使DNA甲基轉移酶蛋白穩定性增加；並且，NNK也可以透過AKT路徑以活化異源核糖核蛋白U (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U [hnRNP-U])，進而將 β TrCP蛋白由細胞核運送至細胞質，使得DNA甲基轉移酶蛋白不被降解而在細胞核中累積 [21]。

在一項以急性淋巴性白血病 (acute myeloid leukemia) 細胞株所進行的研究中觀察到，阻斷DNMT3B的表現能夠使整體DNA甲基化程度減少3%，如果同時阻斷DNMT1與DNMT3B的表現卻可以使整體DNA甲基化程度減少95%；特別的是，向下調控DNA甲基轉移酶的表現亦可透過啟動子的低度甲基化來讓已默化的基因再度表現 [22]。因此，DNA甲基轉移酶的增強表現是導致腫瘤抑癌基因其啟動子區域產生高度甲基化而默化其功能的重要關鍵。Kim等人 [20] 於102名非小細胞肺癌病患中也觀察到，DNMT1和DNMT3B mRNA於腫瘤組織中的表現相較於正常組織中的表現分別提高了53%與58%。在肺癌組織中證實，腫瘤抑癌基因其啟動子區域的高度甲基化與DNA甲基轉移酶蛋白表現具有相關性，特別是抽菸的鱗狀細胞癌 (squamous carcinoma) 病患；抽菸者其肺癌組織中的

DNMT1、DNMT3A以及DNMT3B蛋白皆具有高度表現，並且DNA甲基轉移酶高度表現的患者其預後也較差 [17, 21]。

許多腫瘤抑制基因已經被描述其啟動子區域異常甲基化的情形是與腫瘤的形成具有相關，包括DNA修補基因MGMT、參與調控細胞週期的P16^{INK4a}、以及麩胺基硫轉移酶mu 2 (glutathione S-transferase mu 2 [GSTM2])，這些基因都可在早期腫瘤組織中被觀察到具有啟動子區域異常甲基化的情形 [23-25]。重要的是，香菸也已經被認為可以引起DNA甲基化 [26]，這可能是抽菸所引起的相關癌症之關鍵機制。一項包括美國、澳洲、日本與台灣四個國家共同合作的大型研究發現，抽菸者相較於非抽菸者其腫瘤抑制基因具有顯著較高的甲基化狀態；特別的是，美國與澳洲的肺癌病患相較於日本與台灣的肺癌病患其DNA修補基因O₆-甲基鳥糞嘌呤-DNA甲基轉移酶 (O₆-methylguanine-DNA- methyltransferase [MGMT]) 與去毒性基因麩胺基硫轉移酶P1 (GSTP1) 也具有顯著較高的甲基化比例 [27]。腫瘤抑制基因的甲基化程度在不同國家之研究對象中所顯現出的如此差異，可能反映著族群之抽菸比例或肺癌組織學型態的不同，尚有可能是其他的生活型態因子或是影響腫瘤抑制基因甲基化表現的不同分子構造所導致。

茶在亞洲國家是被大量地飲用，例如日本、中國和台灣 [28]。實驗研究已經一致地顯示，茶品和茶多酚 (polyphenols) 可能抑制多種癌症的發生，包括肺癌 [29]；本研究團隊的先前結果也指出，未飲用綠茶的抽菸者相較於飲用綠茶的抽菸者具有較高的肺癌發生危險；並且未飲用綠茶與抽菸對於肺癌的發生危險亦具有明顯的交互作用存在 [30]。然而，飲茶和癌症的流行病學研究仍是有限的，結果也尚未明確 [30-34]。於飲茶和肺癌危險之間所被報告的相關性，其不一致的因素可能是因為研究的統計變異程度或者是呈現於研究中的各種偏差所

導致。此外，飲茶也被報導是相關於較健康的生活型態 [35]。

茶多酚，即已知的兒茶素 (catechins)，通常在沖泡的綠茶中佔固體乾重的30-42% [36]；而茶 (發酵過之產物) 中主要的多酚類成分是茶黃素theaflavins (1-3%的乾重) 和茶紅素thearubigins (10-40%的乾重)。與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [37, 38]。在一項先前的研究中觀察到，茶多酚可防止暴露於紫外線UVB之無毛的SKH-1雌性小鼠之脂質過氧化物形成 [39]，這項結果說明了茶多酚可能是潛在的抗氧化物。此外，許多相關研究結果已經一致地顯示，綠茶可能抑制許多物理性及化學性物質所引發的癌症 [29]。因為在許多不同的族群中，吸菸和飲茶是非常地普遍，許多研究也加以探討茶對於吸菸所導致之肺癌形成的可能抑制效應 [40, 41]。在不同的實驗動物模式中，綠茶可以抑制多種致癌性物質所引發之肺癌形成，包括N-nitrosodiethylamine和NNK [30]。茶多酚也被顯示可以抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 [42, 43]；目前這些抑制效應的機制還不清楚，雖然部分研究者認為是多酚所貢獻的效應，但茶多酚是透過何種機轉產生抑制腫瘤效應，目前還沒有直接的證據 [29, 39-42]。

有趣的是，低濃度的茶多酚主要成分沒食子酸酯化兒茶素 (epigallocatechin-3-gallate [EGCG]) 對於腫瘤抑制基因P53具有向上調控的功能，並且可以誘發細胞分裂停滯與DNA修補，而高濃度的EGCG則會引起細胞凋亡 [44]；EGCG在人類大腸癌細胞株中也顯著地具有抗增生的效應 [45]。重要的是，EGCG在不同癌症細胞株中都能夠抑制DNA甲基轉移酶的表現，包括肺癌 [46, 47]，主要是EGCG可以與DNMT1高度結合，因而抑制DNMT1活性 [47]；雖然在細胞核萃取物中DNMT3A與DNMT3B是較少量的，而EGCG抑制DNMT3A

與DNMT3B的可能性仍是存在的 [48]。因此，綠茶是否可能抑制抽菸所導致的DNA甲基化，進而降低癌症的發生，這是值得加以探討的課題。

人類的DNMT1、DNMT3A與DNMT3B基因分別是位於染色體19p13.2、2p23、以及20q11.2的位置，此三種基因也分別具有若干的單一核苷酸多形性 (*single-nucleotide polymorphism [SNP]*) [49]。目前已知並未具有位於DNMT1基因啟動子區域之單一核苷酸多形性，然而根據候選基因法 (*candidate gene approach*)，在編碼區內之單一核苷酸多形性具有可改變胺基酸者也可能會對於蛋白功能有所影響；因此，我們將納入DNMT1在編碼區內之單一核苷酸多形性具有可改變胺基酸者進行探討。DNMT1在exon 4核苷酸+32204 (rs2228612) 位置具有一個A至G的鹼基置換 (HaPMaP-HCB之漢人A的頻率為0.48，G為0.52)，並且導致胺基酸由異白胺酸 (Isoleucine) 變異成苯丙胺酸 (Phenylalanine)，而攜帶G對偶基因者相較於A對偶基因者呈現出較低的DNMT1甲基化程度 [50]。在DNMT1 +14395 (rs16999593) 位置也具有一個T至C的鹼基置換 (MapCHB之漢人C的頻率為0.17)，並且導致胺基酸由組胺酸 (Histidine) 變異成精胺酸 (Arginine) [51]，而+14395 C對偶基因相較於T對偶基因具有較高的胃癌與乳癌發生危險 [49, 51]，但是如此的鹼基變異對於DNMT1 mRNA以及蛋白表現的改變影響是未知的。在DNMT3A啟動子序列轉錄起始上的核苷酸-448 (rs1550157) 位置包含了一個G至A的轉換 (MapCHB之漢人C的頻率為0.34)，此變異能夠增加啟動子轉錄活性 [52]，並且DNMT3A -448基因多形性也與癌症之發生具有相關性 [52]，但與肺癌的關係目前仍不清楚。在DNMT3B啟動子序列核苷酸-149 (rs2424913) 與-579 (rs1569686) 的位置分別包含了一個T至G (MaPCHB之漢人T的頻率為0.012) 與G至T (CHB+JPT low coverage panel之東亞人的頻率為0.13)

的轉換 [53, 54]，目前並不完全明瞭此兩個置換對於DNMT3B表現的整體影響；然而，證據顯示在DNMT3B啟動子上的變異是可以增加啟動子活性，並且可能向上調控參與在一些腫瘤抑制基因之CPG群島重新甲基化作用的基因之表現 [55, 56]。此外，先前的研究已經觀察到DNMT3B -149與-579的基因多形性與若干癌症的發生是具有相關性的，包括肺癌 [54, 57, 58]。

DNA甲基轉移酶可能因為其基因多形性而影響其啟動子活性，進而修飾下游基因表現與增加疾病的發生危險 [55]；因此，以功能性研究來驗證DNMT1、DNMT3A、DNMT3B基因型與其表現的相關性是具重要性的切入點，並且值得來加以探討這些基因多形性與肺癌相關之腫瘤抑制基因甲基化程度的關係。

微型核糖核酸是一段長約20-22個核苷酸，長髮夾型的單股RNA分子 [59]。微型核糖核酸會藉由類似RNA干擾 (RNA interference [RNAi]) 的機制將RNA降解，也可以透過阻擋蛋白轉譯而抑制基因表現，或者可以鍵結在目標mRNA的3'端非編碼區 (3' untranslated region [3' UTR])，導致mRNA降解與抑制mRNA的轉譯 [60]；並且微型核糖核酸與調節細胞的分化、細胞週期與凋亡、以及免疫功能具有相關 [59]。

微型核糖核酸-29家族，包括miR-29a、miR-29b以及miR-29c。重要的是，miR-29b會直接標的鍵結在DNMT3A與DNMT3B的3' UTR端或者間接地透過轉錄因子特化蛋白 (specificity protein 1 [SP1]) 來鍵結至DNMT1，而減少DNA甲基轉移酶的表現，進而使已被甲基化而默化的腫瘤抑制基因再度表現 [61, 62]。已知茶多酚可能在癌細胞中抑制DNMT3B的表現 [46, 47]；一項近期的研究也在aPoE基因剔除的小鼠中觀察到，多酚可反向調控受到aPoE突變所影響的miR-29表現，並使之回復正常 [63]。一項急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia) 之

臨床試驗觀察到，病患接受低劑量的DNA甲基轉移酶抑制劑decitabine治療之前的miR-29b表現量是相對於病患對於治療藥物的反應；這項結果反映著，在骨髓性母細胞 (myeloid blasts) 中，具有較高的miR-29b表現將會導致較低的DNA甲基轉移酶表現的可能性，並且增加對於decitabine產生低度甲基化效應的敏感性 [64]。因此，miR-29b可能扮演著一個腫瘤抑制者 [65]。目前，尚未有相關研究探討miR-29b是否具有單一核苷酸多形性，並且對其與DNA甲基轉移酶的機轉目前也未明瞭，因此值得我們來加以探討。

人類GST-mu基因位於染色體1P13的位置，是GST家族中酸性同功酶 μ 的編碼基因，可透過催化還原型麩胺基硫 (glutathione) 和多種親電子性 (electrophilic) 化合物結合，使其更具極性而由體內排出，包括PAH與BPDH (7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a) pyrene) [66-68]。GSTM1與GSTM2有高達90%的重複性 [68, 69]，並且先前的研究已經指出，GSTM1的缺失與肺癌的發生是具有高度相關性 [67, 70]；當GSTM1有兩個對偶基因喪失，並且暴露於香菸致癌物質環境下，則容易堆積較多的BPDE-DNA鍵結物 [71]。GSTM2的基因表現也已經被注意到與癌症易感受性具有相關性，並且較低的GSTM2表現呈現出增加的致癌性；因此，GSTM2也被認為是種腫瘤抑制基因 [72, 73]。先前的研究發現，GSTM2基因過度表現顯著地降低腫瘤的生長與轉移；並且，GSTM2在肺癌細胞株中表現量降低的可能原因是其啟動子受到甲基化而使基因失去表現 [73]。如此的結果符合腫瘤抑制基因因高度甲基化而靜默其表現，則也可能促成了細胞惡性轉化 [15]。重要的是，GSTM2亦可能是受到DNA甲基轉移酶之結構功能與表現所影響，進而導致其靜默並且失去腫瘤抑制能力；此外，綠茶是否可能抑制抽菸對於GSTM2基因所導致的DNA甲基

化，目前也是尚未被探討。

人類BIM基因位於染色體2q12-q13的位置，此腫瘤抑制基因是BCL家族成員之一；其所製造出的產物只含有BCL-2同源結構區域3 (BCL-2 homology domain 3 [BH3])，能夠與抑制凋亡蛋白BCL-2結合，進而促進細胞凋亡 (apoptosis) 作用 [74, 75]。在非小細胞癌中，BCL-2引導的上皮細胞生長因子接受體 (epidermal growth factor receptor [EGFR]) 基因突變能夠活化PI3K/AKT/mTORC和MER/ERT訊息傳遞，決定細胞存活與凋亡；另一方面，BIM基因的BH3區域缺失則導致細胞凋亡功能受阻 [76]。在慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia) 與非小細胞肺癌細胞株中，BIM基因多形性為可賦予酪氨酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitors [TKI]) 抗性，但此抗性可透過BH3藥物加以克服；然而，在BIM基因多形性缺失的病患中，其BIM基因所轉譯出的BH3蛋白則出現截斷現象，此現象導致病患具有較差的存活與對於藥物產生抗性 [77]。在先前的細胞株實驗中也發現，BIM可受到DNA甲基轉移酶之高度甲基化而靜默其表現；然而，給予組織蛋白去乙酰化酶抑制劑A (histone deacetylase inhibitor trichostatin A) 可恢復組織蛋白乙酰化酶，並且能夠上調BIM表現與誘導細胞死亡 [78]。BIM大量表現於細胞膜與細胞質中，在膠原蛋白誘發之大鼠關節炎 (collagen-induced arthritis [CIA]) 中發現BIM蛋白表現較低；然而，經由EGCG處理的CIA大鼠則發現BIM蛋白表現顯著增加，如此的結果可能反映著綠茶中的EGCG能夠透過PI3K/AKT/mTORC訊息路徑來促使細胞凋亡 [79]。目前對於BIM基因的探討，主要著眼在探討酪氨酸激酶抑制劑的使用和病人之存活。但是，抽菸是否會導致BIM基因的DNA甲基化，目前則無證據。此外，目前也不清楚綠茶成分以及DNA甲基轉移酶表現是否會影響BIM的甲基化程度，因而使其恢復或喪失腫瘤抑制能

力；甚至目前仍不明白BIM本身的基因型是否也會影響其基因表現。然而，這些都是值得來加以瞭解與探討，相關的結果都會使得我們更能夠了解BIM除了在臨床上的應用價值之外，其對於公共衛生研究議題的貢獻。

抽菸所導致的肺癌是世界各地的重要公共衛生議題，並且抽菸會促使腫瘤抑制基因過度甲基化而容易引起癌症的發展；針對抽菸所可能相關的表觀遺傳來進一步地探討，將有助於更加理解其致癌機轉。另一方面，綠茶可能抑制DNA甲基轉移酶與腫瘤抑制基因的表現，進而降低癌症的發生；此外，DNA甲基轉移酶與腫瘤抑制基因本身的基因型亦有可能影響其基因之表現。更進一步地，miR-29b之表現也可能影響DNA甲基轉移酶之表現。因此，本計畫將探討香菸暴露與成分對於DNA甲基轉移酶之表現以及腫瘤抑制基因甲基化程度的影響，並且是否與肺癌的發展及存活具有相關性。進一步地，本研究也將釐清綠茶中的茶多酚EGCG以及miR-29b的基因多形性與其表現是否可調控DNA甲基轉移酶的表現；同樣地，分析DNA甲基轉移酶其本身基因多形性對於自身DNA甲基轉移酶表現之影響。此外，本研究也將評估腫瘤抑制基因GSTM2與BIM是否會透過DNA甲基轉移酶來導致其甲基化，並且是否會因為綠茶飲用與成分、以及GSTM2與BIM的基因多形性而導致其表現程度差異，進而影響肺癌的發展與存活。因此，我們設計流行病學與細胞實驗來探討與印證在不同的香菸與綠茶成分暴露狀態中，DNA甲基轉移酶、miR-29b、腫瘤抑制基因GSTM2與BIM分別之基因多形性、甲基化程度以及表現彼此間的關係，以及對於肺癌發生與存活之影響。

材料與方法

研究對象與流行病學資料

在整個研究中，對於參與者的實驗進行以及疾病史之收集都將是符合赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki)，並且獲取所有研究對象的書面同意書；研究設計是由參與本研究之機構的倫理委員會 (Institutional Review Board) 所批准。從 2015 年 8 月至 2018 年 7 月，在台中中山醫學大學附設醫院、澄清醫院、以及童綜合醫院收集 251 名原發性肺癌病患 (國際疾病分類第 10 版，ICD10 代碼 C33-C34) 至本研究中，這些醫院對於來自所有社會經濟階層的病患皆具有可近性。全部病例由合格的病理學家執行一系列的病理階段檢查，腫瘤的類型和階段也依據世界衛生組織 (World Health Organization) 的分類方式來決定 [80]。在此病例對照研究中，每一名對照根據年齡 (± 5 歲) 及性別被選取來與一名病例進行配對。因此，502 名對照是從不具有癌症病史的病患中隨機地被選取；他們是在相同的教學醫院執行身體健康檢查。

研究對象的流行病學資料是使用標準化問卷執行面對面訪談所收集，問卷所涵蓋的問題包括人口學特質與生活型態，如同我們先前所執行的研究 [30]。研究對象的抽菸習慣包括每天抽菸的支數和抽菸年數；累積抽菸量是以抽菸包年來計算，亦即每天的包數乘以抽菸的年數。在台灣，民眾普遍以小陶壺來泡製茶，茶會被倒入小茶杯中 (30-50 ml)，同一批茶葉可沖泡多回。在本研究中，我們將研究對象所描述之飲茶量轉換成標準容器的體積量 (100-120 ml)；研究對象被詢問是否有飲用綠茶，回應為“曾經飲用綠茶者”則進一步地被詢問飲用綠茶年數以及飲用綠茶頻率。飲用綠茶的頻率則是從五個可能得到的答覆去評估，即每天一杯以上、一週三到四杯、一週一到二杯、一個月一到二杯或更少。對於每天飲用綠茶者，每天所飲用的杯數也將被進一步地確認。我們也針對問題的答覆，根據先前的一項追蹤研究，區分成五項類別：每天少於一杯、每天一至二杯、每天

三至四杯、每天五至九杯、每天十杯以上 [81]。為了避免個人在疾病診斷後改變其飲茶習慣而造成對於飲茶攝入的錯誤分組 (misclassification)，我們僅收集在疾病發生前的累積量。在本研究中，綠茶飲用是根據一項先前的研究來評估的 [80]，該研究使用問卷以及根據一年內三天的飲食紀錄來評估綠茶飲用量，兩者間的斯皮爾曼相關係數 (Spearman' s correlation coefficient) 為 0.66；並且藉由兩份問卷評估相隔六個月前後之綠茶飲用量，兩者之間的斯皮爾曼相關係數也為 0.66。以相似的問卷來評估綠茶飲用也在其他的研究中被運用 [82, 83]，這意味著此評估方法具有一定的效度。水果及蔬菜的攝取也從普遍可獲得並且一般被攝取的種類中，計算出最近三年的每週標準化平均餐數。對於烹飪的暴露，研究對象是被詢問使用各種烹飪方法的頻率，特別是他們平常的炒菜方式。肺癌家族史，則將是定義為研究對象之一等親親屬具有肺癌者。

DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 基因多形性

DNMT1 +32204 基因型是使用 PCR 增幅後，執行限制片段長度多形性 (restriction fragment length Polymorphism [RFLP]) 分析來偵測；一段包含此基因多形性的 219 bp 之基因體 DNA 片段被增幅，用於增幅 DNMT1 +33204 基因的引發子序列為 5' -AGA ACC TGA AAA AGT AAA TCC ACC G-3' 以及 5' -CTG AAG CGG GTG AAT CAC ATG-3'。0.5 μ l 的 DNA 被加至包含 200 ng 的引發子、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (PH 8.3)、和 0.1% BSA 的 PCR 緩衝溶液中，最後總體積調整為 50 μ l。PCR 循環參數組成為 95°C 下五分鐘之先前培養，接續於 95°C 下 15 秒之變性步驟、60°C 下一分鐘之黏合、以及 72°C 下 40 秒之延展，共 35 回合循環，反應於最後的 72°C 十分鐘之

延展後終止。PCR 產物也在 37°C 下以 5U 的 MsPI 酵素消化 16 小時，消化產物在 2% 瓊膠中以溴化乙錠 (ethidium bromide [EB]) 染色後判讀。同型的 DNMT1 +32204 AA 基因型個體顯現出 219 bp 一段產物片段，同型的 DNMT1 +32204 GG 基因型個體表現出 196 和 23 bp 二段產物片段；而異型的 DNMT1 +32204 AG 基因型者則有 219、196 和 23 bp 三段產物片段。

用以增幅 DNMT1 +14395 基因型的引發子，序列為 5' -GGC TTC ACT TCT TGC TTG GT-3' 以及 5' -ATC AGG CAA TGA GGA CAG CT-3'。PCR 循環參數為於 95°C 下五分鐘之先前培養，接續於 95°C 下 30 秒之變性、67°C 下 30 秒之黏合、以及 72°C 下 30 秒之延展，總共進行 35 回合，反應於最後的 72°C 五分鐘之延展後終止；該 PCR 產物的長度為 249 bp。進一步地，PCR 產物再以 BssSI 酵素於 37°C 下消化 24 小時；同型 TT 基因型者反應出 249 bp 的單一產物片段，而同型 CC 基因型者呈現出 189 和 60 bp，異型 TC 基因型者呈現出所有三個片段。

用以增幅 DNMT3A -448 基因的引發子，序列為 5' -CTC GGC TTC TAC ACC C-3' 以及 5' -GTT TCC CTC TTA TTG TCC AG-3'。PCR 循環參數為 95°C 下五分鐘之先前培養，接續於 95°C 下 30 秒之變性步驟、62°C 下 30 秒之黏合、以及 72°C 下 20 秒之延展，共 35 回合循環，反應於最後的 72°C 五分鐘之延展後終止。該 PCR 產物的長度為 343 bp，PCR 的產物再於 37°C 下進行 BsrGI 限制酶消化 24 小時。同型 GG 基因型的個體表現出一段 343 bp 的產物片段，同型 AA 基因型的個體顯示出一段 241 bp 以及一段 102 bp 的產物片段，而異型 GA 基因型的個體則具有三段產物片段。

用於增幅 DNMT3B -149 基因的引發子，序列為 5' -TGC TGT GAC AGG

CAG AGC AG-3' 和5' - GGT AGC CGG GAA CTC CAC GG-3'。PCR循環參數為於95°C下五分鐘之先前培養，接續於95°C下30秒之變性、63°C下30秒之黏合、以及72°C下30秒之延展，總共進行35回合，反應於最後的72°C五分鐘之延展後終止；該PCR產物的長度為380 bp。進一步地，PCR產物再以BfaI酵素於37°C下消化24小時；同型CC基因型者反映出出208、126和46 bp的三個產物片段，而同型TT基因型者呈現出162、126和46 bp，異型CT基因型者呈現出所有四個產物片段。

GSTM2基因多形性

用以增幅GSTM2基因的引發子序列為5'-CAC TGA CCT CCC AAC AAC CT-3'和5'-TCT TTT TCC CCC TCC TTT CT-3'。0.5 µl的DNA被加至包含200 ng的引發子、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM的dNTPs、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (PH = 8.3) 和0.1%的BSA的PCR緩衝劑中，最後總體積調整為50µl。PCR循環參數組成為95°C下5分鐘之先前培養，接續進行於95°C下30秒之變性、58°C下30秒之黏合、以及72°C下10分鐘之延展，共35回合循環，反應於最後的72°C 5分鐘之延展後終止。PCR產物也在37°C下以5U的MboII酵素消化24小時，消化產物在3%之瓊膠中以ethidium bromide染色後判讀。攜帶同型的GSTM2 TT基因型個體顯現出228 bp一段產物片段，同型的GSTM2 AA基因型個體表現出159與69 bp兩段產物片段，而異型的GSTM2 AT基因型者則有228、159、69 bp三段產物片段。

BIM基因多形性

用於增幅BIM基因的引發子序列為5' -AAT ACC ACA GAG GCC CAC AG-3' 以及5' -GCC TGA AGG TGC TGA GAA AG-3'。0.5 µl的DNA被加至包含200 ng的引發子、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl

(PH 8.3)、和0.1% BSA的PCR緩衝溶液中，最後總體積調整為50 μ l。PCR循環參數組成為96 $^{\circ}$ C下30秒之先前培養，接續於94 $^{\circ}$ C下15秒之變性步驟、61 $^{\circ}$ C下一分鐘之黏合、以及72 $^{\circ}$ C下10分鐘之延展，共35回合循環，反應於最後的72 $^{\circ}$ C 10分鐘之延展後終止。消化產物在2%瓊膠中以溴化乙錠染色後判讀。具有BIM野生基因型的個體顯現出4,226 bp一段產物片段，具有BIM缺失基因型的個體則將表現出1,323 bp產物片段。

統計分析

對於病例組與對照組的性別、收案時之年齡、抽菸狀況、抽菸包年、綠茶飲用、蔬菜與水果的攝取量、過往烹煮的暴露、與肺癌家族史之比較，若是連續性變項是以Student' s *t*-test檢定；若是類別性變項則以 χ^2 -test或Fisher' s exact test檢定。 χ^2 -test也被執行以檢定在病例組與對照組中DNMT、GSTM2、以及BIM基因型的盛行率差異。隨後，使用邏輯斯迴歸分析模式 (logistic regression model) 求取每個變項的調整後危險對比值 (adjusted odds ratio [OR]) 以及95%信賴區間 (95% confidence interval [C.I.])。另外，分層分析 (stratification) 被執行以檢定抽菸狀況、綠茶飲用量以及DNMT、GSTM2、以及BIM基因多形性之間是否對於肺癌發生危險性具有交互作用；所有的P值皆以雙尾檢定來計算。

結果

總計，共有753名研究對象 (461名男性與292名女性) 參與本研究，年齡範圍從38歲至93歲，其特徵整理於表一。研究對象中男性所佔的比例為61.3%，女性為38.7%；肺癌病患的平均年齡為65.3歲，對照為64.2歲。如同我們所預期的，

相較於對照，肺癌病例中具有較多抽菸者 (54.2% vs. 31.5% ; OR = 2.57 ; 95% C.I. = 1.89-3.52) ; 33.5%的病例抽菸超過40包年，而在對照中此數值是16.5% (OR = 3.03 ; 95% C.I. = 2.09-4.38)。在飲用綠茶的部分，肺癌病例相較於對照有較高比率之未飲用綠茶者 (76.1% vs. 64.1%) ; 在飲用綠茶的時間上，病例組也僅有11.5%超過十年，相較於對照組17.8%是具有顯著的差異。然而，蔬果攝取在病例與對照組間並沒有顯著的差異。此外，相較於對照，炒菜油煙暴露以及肺癌家族史在病例組有較高的比例，並且此差異達到統計上的顯著性。

研究對象之 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、GSTM2、BIM 基因型的盛行率，顯示在表二。在病例組中，DNMT1 +32204的 A 與 G 對偶基因的頻率分別是63.6%以及36.4%，而對照組的 A 與 G 對偶基因的頻率分別是60.1%以及39.9% ; 基因型頻率分佈在病例組與對照組間並沒有顯著的差異 (OR = 1.16 ; 95% C.I. = 0.93-1.45)。在病例組中，DNMT1 +14395的 T 與 C 對偶基因的頻率分別是74.0%以及26.0%，而對照組的 T 與 C 對偶基因的頻率分別是68.7%以及31.3% ; 基因型頻率分佈在病例組與對照組間具有顯著的差異 (OR = 1.30 ; 95% C.I. = 1.02-1.62)。在病例組中，DNMT3A -448的 G 與 A 對偶基因的頻率分別是5.4%以及94.6%，而對照組的 G 與 A 對偶基因的頻率分別是4.5%以及95.5% ; 基因型頻率分佈在病例組與對照組間並沒有顯著的差異 (OR = 1.20 ; 95% C.I. = 0.73-1.97)。在病例組中，DNMT3B -149的 T 與 C 對偶基因的頻率分別是96.4%以及3.6%，而對照組的 T 與 C 對偶基因的頻率分別是93.0%以及7.0% ; 基因型頻率分佈在病例組與對照組間具有顯著的差異 (OR = 1.99 ; 95% C.I. = 1.17-3.37)。在病例組中，GSTM2的 T 與 A 對偶基因的頻率分別是14.0%以及86.0%，而對照組的 T 與 A 對偶基因的頻率分別是8.3%以及91.7% ; 基因型頻率分佈在病例組與

對照組間具有顯著的差異 (OR = 1.79 ; 95% C.I. = 1.27-2.53)。在病例組中，BIM的-與+對偶基因的頻率分別是8.8%以及91.2%，而對照組的-與+對偶基因的頻率分別是8.3%以及91.7%；基因型頻率分佈在病例組與對照組間並沒有顯著的差異 (OR = 1.06 ; 95% C.I. = 0.73-1.56)。

我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 DNMT1 +32204對於肺癌發生危險之相關 (表三)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT1 +32204 GG 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT1 +32204 GG 基因型之抽菸者具有4.02倍 (95% C.I. = 1.52-10.66) 的肺癌發生危險，攜帶 DNMT1 +32204 AG 基因型之抽菸者具有5.95倍 (95% C.I. = 2.83-12.49) 的肺癌發生危險；然而，攜帶 DNMT1 +32204 AA 基因型之抽菸者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 7.18, 95% C.I. = 3.33-15.48)。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 DNMT1 +32204 GG 基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT1 +32204 AA 基因型與 DNMT1 +32204 AG 基因型且抽菸包年為1-39包年分別具有5.98倍及4.97倍的肺癌發生危險，攜帶 DNMT1 +32204 AA 基因型且抽菸包年為大於40包年者 (OR = 7.90, 95% C.I. = 3.39-18.37) 具有顯著較高的肺癌發生危險性。接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估 DNMT1基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表四)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT1 +32204 GG 基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 DNMT1 +32204 AG 基因型之飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險性；而攜帶 DNMT1 +32204 AA 基因型之未飲用綠茶者也具有2.01倍 (95% C.I. = 0.68-5.90) 肺癌發生危險性，但同樣地並未達到統計上的顯著性。

我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 DNMT1 +14395對於肺癌發生危險之相關 (表五)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT1 +14395 CC 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT1 +14395 CT 基因型之抽菸者具有5.12倍 (95% C.I. = 1.34-19.64) 的肺癌發生危險，攜帶 DNMT1 +14395 TT 基因型之抽菸者具有7.24倍 (95% C.I. = 2.00-26.21) 的肺癌發生危險；然而，攜帶 DNMT1 +14395 CC 基因型之抽菸者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 10.53, 95% C.I. = 1.91-58.05)。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 DNMT1 +14395 CC 基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT1 +14395 TT 基因型且抽菸包年為1-39包年具有7.66倍的肺癌發生危險，攜帶 DNMT1 +14395 CT 基因型與 DNMT1 +14395 CC 基因型且抽菸包年為大於40包年者皆 (OR = 7.79, 95% C.I. = 1.93-31.51; OR = 12.68, 95% C.I. = 2.08-77.25) 具有顯著較高的肺癌發生危險性。接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估 DNMT1 +14395基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表六)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT1 +14395 CC 基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 DNMT1 +14395基因型之未飲用綠茶者則具有1.92倍 (95% C.I. = 0.64-5.76) 肺癌發生危險性，但同樣地並未達到統計上的顯著性。

隨後，我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 DNMT3A -448基因型對於肺癌發生危險之相關 (表七)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型之抽菸者具有6.22倍 (95% C.I. =

3.23-11.96) 的肺癌發生危險；然而，攜帶 DNMT3A -448 GA 基因型之抽菸者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 17.25, 95% C.I. = 3.64-81.70)。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 2.86, 95% C.I. = 1.36-6.02)、以及攜帶 DNMT3A -448 GA 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 15.58, 95% C.I. = 2.57-94.38) 分別具有顯著的肺癌發生危險性，攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型且抽菸包年大於40包年 (OR = 5.20, 95% C.I. = 2.71-9.97)；並且，累積抽菸量與 DNMT3A -448基因型對於肺癌發生危險性也具有顯著的交互作用存在 (P = 0.04)。接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估 DNMT3A -448基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表八)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型與 DNMT3A -448 GA 基因型之未飲用綠茶者皆具有顯著的肺癌發生危險性；而攜帶 DNMT3A -448 GA 基因型之未飲用綠茶者相較於攜帶 DNMT3A -448 AA 基因型之綠茶飲用年數大於10年則具有2.94倍 (95% C.I. = 0.99-8.71) 的肺癌發生危險性，並且呈現邊緣顯著 (P = 0.0522)。

我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 DNMT3B -149基因型對於肺癌發生危險之相關 (表九)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT3B -149 CT 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3B -149 TT 基因型之抽菸者具有6.98倍 (95% C.I. = 2.33-20.90) 的肺癌發生危險。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 DNMT3B -149 CT 基因型之抽菸包年為0包年者做

為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 DNMT3B -149 TT 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 4.14, 95% C.I. = 1.48-11.56) 具有顯著的肺癌發生危險性，攜帶 DNMT3B -149 TT 基因型且抽菸包年大於40包年 (OR = 5.82, 95% C.I. = 2.09-16.26)；並且，累積抽菸量與 DNMT3B 基因型對於肺癌發生危險性也具有顯著的交互作用存在 (P = 0.004)。接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估 DNMT3B -149基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表十)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 DNMT3B -149 CT 基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 DNMT3B -149 TT 基因型之未飲用綠茶者具有顯著的肺癌發生危險性 (OR = 3.76, 95% C.I. = 1.04-13.58)；而攜帶 DNMT3B -149 TT 基因型之未飲用綠茶者相較於攜帶 DNMT3B -149 CT 基因型之綠茶飲用年數大於10年則具有3.45倍 (95% C.I. = 0.58-20.56) 的肺癌發生危險性，但並未達統計顯著性。

我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 GSTM2基因型對於肺癌發生危險之相關 (表十一)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 GSTM2 AA 基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 GSTM2 TT 基因型之非抽菸者具有4.94倍 (95% C.I. = 1.16-15.66) 的肺癌發生危險；然而，攜帶 GSTM2 TT 基因型之抽菸者則具有顯著較高的肺癌發生危險 (OR = 12.81, 95% C.I. = 2.96-55.52)。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 GSTM2 AA 基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 GSTM2 AA 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 3.81, 95% C.I. = 2.03-7.14)、攜帶 GSTM2 TA 基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 11.20, 95% C.I. = 3.72-33.72)、以及攜帶 GSTM2 TT 基因型且抽菸包年為1-39

包年 (OR = 22.44, 95% C.I. = 1.70-296.83) 分別具有顯著的肺癌發生危險性，攜帶 GSTM2 AA 基因型且抽菸包年大於40包年 (OR = 6.89, 95% C.I. = 3.96-11.99)、以及攜帶 GSTM2 TT 基因型且抽菸包年大於40包年 (OR = 9.45, 95% C.I. = 1.68-53.27) 皆具有顯著較高的肺癌發生危險。接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估 GSTM2基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表十二)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 GSTM2 AA 基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 GSTM2 TA 基因型之飲用綠茶者具有4.05倍的肺癌發生危險；攜帶 GSTM2 TA 基因型與 GSTM2 TT 基因型之未飲用綠茶者皆具有顯著的肺癌發生危險性；而攜帶 GSTM2 TT 基因型之未飲用綠茶者相較於攜帶 GSTM2 AA 基因型之綠茶飲用年數大於10年則具有16.54倍 (95% C.I. = 4.33-63.19) 的肺癌發生危險性，並且飲用綠茶與飲用綠茶年數與 GSTM2 基因具有顯著的交互作用關係 (P = 0.02)。

最後，我們在抽菸狀況及抽菸包年分組中，分析不同 BIM 基因型對於肺癌發生危險之相關 (表十三)。在調整性別、年齡、綠茶飲用、炒菜油煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 BIM +/+基因型者之非抽菸者 (OR = 1.00)，則攜帶 BIM -/+基因型之抽菸者具有5.59倍 (95% C.I. = 2.61-11.99) 的肺癌發生危險。我們也以0、1-39以及大於40包年之累積抽菸量分層加以評估，同樣地選取攜帶 BIM +/+基因型之抽菸包年為0包年者做為參考組 (OR = 1.00)，則攜帶 BIM +/+基因型且抽菸包年為1-39包年 (OR = 5.47, 95% C.I. = 2.93-10.22) 具有顯著的肺癌發生危險性，攜帶 BIM -/+基因型且抽菸包年大於40包年 (OR = 7.41, 95% C.I. = 2.96-18.55)。接續，我們在綠茶飲用狀態分組中評估 DNMT3B-149基因型對於肺癌發生危險性之相關 (表十四)。在調整性別、年齡、抽菸包年、炒菜油

煙暴露與肺癌家族史的效應後，相較於攜帶 BIM +/+ 基因型之飲用綠茶者 (OR = 1.00)，攜帶 BIM -/+ 基因型之未飲用綠茶者具有顯著的肺癌發生危險性 (OR = 2.78, 95% C.I. = 1.50-5.14)；而攜帶 BIM +/+ 基因型與攜帶 BIM -/+ 之未飲用綠茶者相較於攜帶 BIM +/+ 基因型之綠茶飲用年數大於10年則分別具有2.04倍 (95% C.I. = 1.15-3.63) 與2.99倍 (95% C.I. = 1.43-6.27) 顯著較高肺癌發生危險性。

討論

現今的研究觀察到，DNMT1 +14395 T 對偶基因型者相較於攜帶 DNMT1 +14395 C 對偶基因型者、DNMT3B -149 TT 基因型者相較於攜帶 DNMT3B -149 CT 基因型者、以及 GSTM2 TT 基因型者相較於攜帶 GSTM2 AA 基因型者分別皆具有較高的肺癌發生危險；抽菸與 DNMT1 +32204 基因型、DNMT1 +14395 基因型、DNMT3A -448 基因型、DNMT3B -149 基因型、GSTM2 基因型、以及 BIM 基因型對於肺癌有較高的發生危險；並且抽菸與 DNMT3A -448 基因型與 DNMT3B -149 基因型對於肺癌的發生危險性具有顯著的交互作用存在；飲用綠茶與 DNMT3A -448 基因型、DNMT3B -149 基因型、GSTM2 基因型、以及 BIM 基因型對於肺癌有較高的發生危險；並且飲用綠茶與 DNMT1 +14395 基因型與 GSTM2 基因型對於肺癌的發生危險性具有顯著的交互作用存在。

香菸成分中的重要致癌物 NNK 已經被建議可以引起 DNA 甲基化，因而導致若干癌症的發生，包括肺癌 [21]。NNK 可以透過 AKT 路徑而減弱 β TrCP 降解蛋白的能力，因此使 GSK3 β / β TrCP 蛋白降解體路徑去活化；並且也會藉由此路徑將 hnRNP-U 穿梭蛋白磷酸化，並將 β TrCP 蛋白由細胞核運送至細胞質，使得 DNMT 蛋白不易被降解，而在細胞核中大量累積，進而使抑癌基因的啟動子

高度甲基化並造成基因默化，進而可能導致肺癌的發生 [21]。有趣的是，我們現今的研究在吸菸者中觀察到攜帶 DNMT1 +32204、DNMT1 +14395、DNM3A -448、DNMT3B -149、GSTM2、以及 BIM 易感受基因型者皆具有較高的肺癌發生危險性；並且，抽菸狀態與 DNMT3A -448 與 DNMT3B -149 易感受基因型對於肺癌發生危險性也具有明顯的交互作用存在。然而，如此的觀察在未來仍需要進一步的功能性研究來加以確認，例如驗證 NNK 可否透過 AKT 路徑來使 DNA 甲基轉移酶蛋白累積。

許多實驗研究報告顯示，綠茶可能抑制許多由物理性及化學性致癌物所引發的癌症 [29]；而與飲茶相關的潛在健康效益，已經部分被歸因於茶多酚的抗氧化特性 [37, 84]。茶多酚明顯地是種強抗氧化物，並且可以有效地清除自由基，它們也可能預防致突變性和基因毒性，抑制腫瘤的起始、促進、以及細胞增生；調控去毒性酵素，並且清除致癌物的活化代謝產物 [29, 85]。茶多酚也已經被顯示，可抑制體內肺癌細胞的生長以及從過氧化氫產生所造成的細胞凋零 [42, 43]。這些證據支持著我們的結果，未飲用綠茶者相較於飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險。特別的是，我們先前的研究也發現 [30]，綠茶飲用與抽菸對於肺癌之發生危險是具有交互作用存在的；未飲用綠茶者較飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險性，而在吸菸者中此效應更為明顯。

在基因啟動子區域上的 DNA 序列發生了甲基化修飾作用，尤其是在 CPG 相連的核酸序列，主要是利用 SAM 做為甲基的提供者，再以 DNMTs 當作催化劑 [13]。此外，先前的研究指出茶多酚中的沒食子酸酯化兒茶素 [EGCG] 在不同組織或癌症細胞中能夠抑制 DNMT 的活性，進而可能降低腫瘤的發生 [46, 47]。而茶多酚可能透過兩種機制來參與抑制 DNA 的甲基化，一是茶多酚可以直

接抑制 DNMT 的活性，另一則是茶多酚間接藉由兒茶酚-O-甲基轉移酶 (catechol-O-methyltransferase[COMT]) 來減少 SAM，導致 DNMT 作用被抑制。此外，我們並無法實際評估茶多酚於人體中之生物利用度，也未能評估 COMT 基因的角色。未來的研究應該致力於瞭解 COMT 基因對於綠茶所抑制肺癌相關之 DNA 甲基化的影響，並且評估綠茶飲用對於其他 DNMT 甲基化表現與肺癌發生關係之影響。然而，在先前的研究中也發現 BIM 大量表現於細胞膜與細胞質中，在膠原蛋白誘發之大鼠關節炎 (collagen-induced arthritis [CIA]) 中發現 BIM 蛋白表現較低；然而，經由 EGCG 處理的 CIA 大鼠則發現 BIM 蛋白表現顯著增加，如此的結果可能反映著綠茶中的 EGCG 能夠透過 PI3K/AKT/mTORC 的訊息路徑來促使細胞凋亡 [79]。這些證據支持著我們的結果，未飲用綠茶者相較於飲用綠茶者具有較高的肺癌發生危險。

許多人類的觀察研究建議蔬果的攝取對於肺癌的預防是有益的，大部分的證據傾向於蔬果攝取與肺癌危險呈現反向關係；但是在一項西班牙的病例對照研究中，並沒有發現蔬果攝取對於肺癌具有保護效應 [86]。我們的結果也顯示，蔬果攝取與肺癌危險並沒有一致性的結果。可能的原因是利用問卷去估計蔬果攝取量是無法準確評估實際的攝取量，並且造成估計上的偏差；對於多數研究對象而言，估計特定種類的蔬果攝食頻率是有困難的。蔬果攝取量與肺癌危險之間的關係，仍有待進一步的研究來加以釐清。烹飪油煙的複雜成分中，芳香雜環化合物 (aromatic heterocyclic amines [HCAs]) 是主要的致癌物，並且與肺癌相關 [87]。在我們的研究中，炒菜油煙每週暴露的時間對於肺癌發生危險有一個趨勢關係存在；特別在炒菜油煙每週暴露大於三小時以上者具有較高的肺癌發生危險。另外，我們也去詢問病例以及對照其肺癌家族史，並且病例相較於對照具有較高比

例的肺癌家族史。這項結果顯示，肺癌的家族危險性可能是歸因於遺傳因子或是共同的環境因子。

我們研究對象之 DNMT、GSTM2、以及 BIM 基因多形性的頻率也符合哈溫定律，證實著我們基因型技術的可信性和成果。在本研究中，我們的研究對象樣本數較少，因此經過分層分析後，會限制基因型與肺癌發生危險相關判定的檢定力；並且使用問卷詢問綠茶飲用量以及茶品種類的錯誤分類，可能無法準確評估綠茶實際攝取的劑量。因此，未來仍需增加研究對象的樣本數以及設計更有效的研究方法，以更確立我們的結果。

我們的結果建議著，在抽菸者中，DNMT、GSTM2、以及 BIM 易感受基因型可能增加啟動子的活性，進而造成 DNA 高度甲基化，而導致肺癌的發生。

參考文獻

1. Ferlay J. Soerjomataram I. Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 136:E359-86, 2015.
2. Department of Health, Executive Yuan, Republic of China (1982-2012). *Health statistics, vol. II. Vital statistics 1981-2011*. Taipei: Department of Health.
3. Boyle P. Maisonneuve P. Lung cancer and tobacco smoking. *Lung Cancer*. 12:167-81, 1995.
4. Hoffmann D. Djordjevic MV. Hoffmann I. The changing cigarette. *Prev Med*. 26:427-34, 1997.
5. Pryor WA. Prier DG. Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect*. 47:345-55, 1983.

6. Pryor WA. Hales BJ. Premovic PI. et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science*. 220:425-7, 1983.
7. Hecht SS. Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Lancet Oncol*. 391:603-13, 2006.
8. Chen RJ. Chang LW. Lin P. et al. Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview. *J Oncol*. 2011:654931, 2011.
9. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 16:6-21, 2002.
10. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 358:1148-59, 2008.
11. Jones PA. Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 3:415-28, 2002.
12. Jones PA. Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 293:1068-70, 2001.
13. Taby R. Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*. 60:376-92, 2010.
14. Saxonov S. Berg P. Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:1412-7, 2006.
15. Herman JG. Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349:2042-54, 2003.
16. Portela A. Esteller M. Epigenetic modification and human disease. *Nat Biotechnol*. 28:1057-68, 2010.
17. Lin RK. Hsu HS. Chang JW. et al. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer*. 55:205-13, 2007.

18. De Marzo AM. Marchi VL. Yang ES. et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 59:3855-60, 1999.
19. Girault I. Tozlu S. Lidereau R. et al. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 9:4415-22, 2003.
20. Kim JS. Kim H. Shim YM. et al. Aberrant methylation of the FHIT gene in chronic smokers with early stage squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis.* 25:2165-71, 2004.
21. Lin RK. Hsieh YS. Liwn P. et al. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *J Clin Invest.* 120:521-32, 2010.
22. Yang XX. He XQ. Li FX. et al. Risk-association of DNA methyltransferases polymorphisms with gastric cancer in the southern Chinese population. *Int J Mol Sci.* 13:8364-78, 2012.
23. Zochbauer-Muller S. Fong KM. Virmani AK. et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 61:249-55, 2001.
24. van Engeland M. Roemen GM. Brink M. et al. K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene.* 21:3792-5, 2002.
25. Ashour N. Angulo JC. Andres G. et al. A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate.* 74:1171-82, 2014.
26. Zhang B. Zhu W. Yang P. et al. Cigarette smoking and P16ink4a gene promoter

- hypermethylation in non-small cell lung carcinoma patients: a meta-analysis. *PLoS One*. 6:e28882, 2011.
27. Toyooka S. Maruyama R. Toyooka KO. et al. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 103:153-60, 2003.
 28. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*. 21:334-50, 1992.
 29. Yang CS. Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst*. 85:1038-49, 1993.
 30. Lin IH. Ho ML. Chen HY. et al. Smoking, green tea consumption, genetic polymorphisms in the insulin-like growth factors and lung cancer risk. *PLoS One*. 7:e30951, 2012.
 31. Goldbohm RA. Hertog MG. Brants HA. et al. Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 88:93-100, 1996.
 32. Zheng W. Doyle TJ. Kushi LH. et al. Tea consumption and cancer incidence in a prospective cohort study of postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 144:175-82, 1996.
 33. Ohno Y. Wakai K. Genka K. et al. Tea consumption and lung cancer risk: a case-control study in Okinawa, Japan. *Jpn J Cancer Res*. 86:1027-34, 1995.
 34. Mendilaharsu M. De Stefani E. Deneo-Pellegrini H. et al. Consumption of tea and coffee and the risk of lung cancer in cigarette-smoking men: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer*. 19:101-7, 1998.
 35. Schwarz B. Bischof HP. Kunze M. Coffee, tea, and lifestyle. *Prev Med*. 23:377-84, 1994.
 36. Balentine DA. Wiseman SA. Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 37:693-704, 1997.

37. Wiseman SA. Balentine DA. Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37:705-18, 1997.
38. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220:262-6, 1999.
39. Vayalil PK. Elmets CA. Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis.* 24:927-36, 2003.
40. Xu Y. Ho CT. Amin SG. et al. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52:3875-9, 1992.
41. Wang ZY. Hong JY. Huang MT. et al. Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone- induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. *Cancer Res.* 52:1943-7, 1992.
42. Yang GY. Liao J. Li C. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis.* 21:2035-9, 2000.
43. Yang GY. Liao J. Kim K. et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 19:611-6, 1998.
44. Zou C. Liu H. Feugang JM. et al. Green tea compound in chemoprevention of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 20:617-24, 2010.
45. Du GJ. Wang CZ. Qi LW. et al. The synergistic apoptotic interaction of panaxadiol and epigallocatechin gallate in human colorectal cancer cells.

- Phytother Res. 27:272-7, 2013.
46. Tang M. Xu W. Wang Q. et al. Potential of DNMT and its epigenetic regulation for lung cancer therapy. *Curr Genomics*. 10:336-52, 2009.
 47. Fang MZ. Wang Y. Ai N. et al. Tea PolyPhenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*. 63:7563-70, 2003.
 48. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 21:5483-95, 2002.
 49. Yang XX. He XQ. Li FX. et al. Risk-association of DNA methyltransferases polymorphisms with gastric cancer in the southern Chinese population. *Int J Mol Sci*. 13:8364-78, 2012.
 50. Arakawa Y. Watanabe M. Inoue N. et al. Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*. 170:194-201, 2012.
 51. Sun MY. Yang XX. Xu WW. et al. Association of DNMT1 and DNMT3B polymorphisms with breast cancer risk in Han Chinese women from South China. *Genet Mol Res*. 26:11, 2012.
 52. Fan H. Liu D. Qiu X. et al. A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma. *BMC Med*. 8:12, 2010.
 53. Daraei A. Salehi R. Mohamhashem F. DNA-methyltransferase 3B 39179 G > T polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in a subset of Iranian population. *J Res Med Sci*. 16:807-13, 2011.

54. Shen H. Wang L. SPitz MR. et al. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res.* 62:4992-5, 2002.
55. Okano M. Bell DW. Haber DA. et al. DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99:247-57, 1999.
56. Robertson KD. Uzvolgyi E. Liang G. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27:2291-8, 1999.
57. Lee SJ. Jeon HS. Jang JS. et al. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis.* 26:403-9, 2005.
58. Liu H. Jiao Y. Guan Y. et al. The DNMT3B -579 G>T promoter polymorphism and risk of lung cancer. *Exp Ther Med.* 3:525-9. 2011.
59. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-97, 2004.
60. Filipowicz W. Bhattacharyya SN. Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet.* 9:102-14, 2008.
61. Fabbri M. Garzon R. Cimmino A. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:15805-10, 2007.
62. Chen KC. Wang YS. Hu CY. et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J.* 25:1718-28, 2011.
63. Milenkovic D. Deval C. Gouranton E. et al. Modulation of miRNA expression

- by dietary polyphenols in apoE deficient mice: a new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One*. 7:e29837, 2012.
64. Blum W. Garzon R. Klisovic RB. et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:7473-8, 2010.
 65. Naghitorabi M. Mohammadi Asl J. Mir Mohammad Sadeghi H. et al. Quantitative evaluation of DNMT3B promoter methylation in breast cancer patients using differential high resolution melting analysis. *Res Pharm Sci*. 8:167-75, 2013.
 66. Board PG. Webb GC. Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet*. 53(Pt 3):205-13, 1989.
 67. Anttila S. Hirvonen A. Vainio H. et al. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases in human lung. *Cancer Res*. 53:5643-8, 1993.
 68. Robertson IG. Guthenberg C. Mannervik B. et al. Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res*. 46:2220-4, 1986.
 69. Sundberg K. Dreij K. Seidel A. et al. Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*. 15:170-9, 2002.
 70. Nazar-Stewart V. Vaughan TL. StaPleton P. et al. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer. *Lung Cancer*. 40:247-58, 2003.

71. Dalhoff K. Buus Jensen K. Enghusen Poulsen H. Cancer and molecular biomarkers of phase 2. *Methods Enzymol.* 400:618-27, 2005.
72. Tang SC. Wu MF. Wong RH. et al. Epigenetic mechanisms for silencing glutathione S-transferase m2 expression by hypermethylated specificity protein 1 binding in lung cancer. *Cancer.* 117:3209-21, 2011.
73. Tang SC. Wu CH. Lai CH. et al. Glutathione S-transferase mu2 suppresses cancer cell metastasis in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res.* 11:518-29, 2013.
74. Bouillet P. Zhang LC. Huang DC. et al. Gene structure alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Mamm Genome.* 12:163-8, 2001.
75. Petros AM. Olejniczak ET. Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1644: 83-94, 2004.
76. Faber AC. Ebi H. Costa C. et al. Apoptosis in targeted therapy responses: the role of BIM. *Adv Pharmacol.* 65: 519-42, 2012.
77. Ng KP. Hillmer AM. Chuah CT. et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med.* 18:521-8, 2012.
78. Piazza R. Magistrini V. Mogavero A. et al. Epigenetic silencing of the proapoptotic gene BIM in anaplastic large cell lymphoma through an MeCP2/SIN3a deacetylating complex. *NeoPlasia.* 15:511-22, 2013.
79. Liu D. Li P. Song S. et al. Pro-apoptotic effect of epigallo-catechin-3-gallate on B lymphocytes through regulating BAFF/PI3K/Akt/mTOR signaling in rats with collagen-induced arthritis. *Eur J Pharmacol.* 690:214-25, 2012.
80. Anonymous. *Histological typing of lung tumors (2nd ed.).* World Health

Organization, Geneva, 1981.

81. Tsubono Y. Nishino Y. Komatsu S. et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med.* 344:632-6, 2001.
82. Jian L. Binns CW. Lee AH. Validity of a food-frequency questionnaire for elderly men in southeast China. *Public Health Nutr.* 9:928-33, 2006.
83. Ogawa K. Tsubono Y. Nishino Y. et al. Validation of a food-frequency questionnaire for cohort studies in rural Japan. *Public Health Nutr.* 6:147-57, 2003.
84. Rice-EvansC. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220(4):262-6, 1999.
85. Ahmad N. Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev.* 57(3):78-83, 1999.
86. Ruano-Ravina A. Figueiras A. Dosil-Diaz O. et al. A population-based case-control study on fruit and vegetable intake and lung cancer: a paradox effect? *Nutr Cancer.* 43(1):47-51, 2002.
87. Seow A. Poh WT. Teh M. et al. Fumes from meat cooking and lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(11):1215-21, 2000.

Table 1. Basic Characteristic of Lung Cancer Patents and Healthy Controls

Variables	Cases N = 251	Controls N = 502	Unmatched OR (95% CI) ^a	Matched OR (95% CI) ^b
Gender				
Male	154 (61.4%)	307 (61.2%)	1.01 (0.74-1.38)	1.01 (0.74-1.38)
Female	97 (38.6%)	195 (38.8%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Age (years, mean ± SD)	65.3±11.7	64.2±11.5		
Smoking status				
Current and ever smokers	136 (54.2%)	158 (31.5%)	2.57 (1.89-3.52) ^c	4.60 (2.91-7.28) ^c
Never smokers	115 (45.8%)	344 (68.5%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Pack-years of smoking				
≥40	84 (33.5%)	83 (16.5%)	3.03 (2.09-4.38) ^c	5.49 (3.30-9.13) ^c
1-39	52 (20.7%)	75 (14.9%)	2.07 (1.37-3.13) ^c	3.65 (2.13-6.24) ^c
0	115 (45.8%)	344 (68.6%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Green tea consumption (cups/day)				
0	191 (76.1%)	322 (64.1%)	3.37 (2.01-5.67) ^c	3.37 (1.98-5.71) ^c
<1	41 (16.3%)	72 (14.3%)	3.24 (1.74-6.02) ^c	3.01 (1.61-5.63) ^c
≥1	19 (7.6%)	108 (21.6%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Green tea consumption (years)				
0	191 (76.1%)	322 (64.1%)	1.82 (1.15-2.87) ^c	1.98 (1.23-3.20) ^d
≤10	31 (12.4%)	91 (18.1%)	1.05 (0.58-1.88)	1.08 (0.60-1.93)
>10	29 (11.5%)	89 (17.8%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Vegetables and fruits intake (servings/week)				
≤14	65 (25.9%)	169 (33.7%)	0.78 (0.54-1.11)	0.78 (1.54-1.12)
15-20	62 (24.7%)	82 (16.3%)	1.53 (1.03-2.27) ^e	1.56 (1.04-2.34) ^e
≥21	124 (49.4%)	251 (50.0%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Exposure to cooking fumes (hours/week)				
≥3	21 (8.4%)	21 (4.2%)	2.20 (1.18-4.12) ^e	2.43 (1.26-4.69) ^d
1-3	23 (9.2%)	25 (5.0%)	2.03 (1.12-3.66) ^e	2.21 (1.19-4.11) ^e
<1	207 (82.4%)	456 (90.8%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
Family history of lung cancer				
Yes	19 (7.6%)	14 (2.8%)	2.86 (1.41-5.79) ^d	3.10 (1.46-6.58) ^d
No	232 (92.4%)	488 (97.2%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)

^aData were calculated by unconditional logistic regression; ^bData were matched by age and gender,

calculated by conditional logistic regression; ^cP<0.001; ^d0.001<P<0.01; ^e0.01<P<0.05.

Table 2. Genotypic Frequency among Lung Cancer Patients and Healthy Controls

Variables	Cases	Controls	Unmatched	Matched	Adjusted
	N=251	N=502	OR (95% CI) ^a	OR (95% CI) ^b	OR (95% CI) ^c
<i>DNMT1 +32204</i> genotypes					
AA	92 (37.4%)	165 (34.1%)	1.58 (0.97-2.57)	1.57 (0.96-2.54)	1.57 (0.91-2.71)
AG	129 (52.4%)	252 (52.1%)	1.45 (0.91-2.31)	1.43 (0.90-2.26)	1.48 (0.89-2.48)
GG	25 (10.2%)	67 (13.8%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
A allele	313 (63.6%)	582 (60.1%)	1.16 (0.93-1.45)	1.14 (0.93-1.39)	1.12 (0.91-1.38)
G allele	179 (36.4%)	386 (39.9%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
<i>DNMT1 +14395</i> genotypes					
TT	134 (54.9%)	232 (47.4%)	1.47 (0.88-2.46)	1.48 (0.88-2.49)	1.50 (0.83-2.72)
CT	93 (38.1%)	209 (42.6%)	1.13 (0.67-1.93)	1.14 (0.67-1.93)	1.11 (0.61-2.03)
CC	17 (7.0%)	49 (10.0%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
T allele	361 (74.0%)	673 (68.7%)	1.30 (1.02-1.65) ^e	1.22 (0.98-1.52)	1.21 (0.96-1.53)
C allele	127 (26.0%)	307 (31.3%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
<i>DNMT3A -448</i> genotypes					
GG	1 (0.4%)	3 (0.6%)	0.68 (0.07-6.57)	0.67 (0.07-6.41)	0.22 (0.01-3.56)
GA	24 (10.0%)	38 (7.9%)	1.29 (0.75-2.20)	1.28 (0.76-2.16)	1.57 (0.88-2.82)
AA	216 (89.6%)	443 (91.5%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
G allele	26 (5.4%)	44 (4.5%)	1.20 (0.73-1.97)	1.20 (0.78-1.86)	1.25 (0.78-2.00)
A allele	456 (94.6%)	924 (95.5%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
<i>DNMT3B -149</i> genotypes					
TT	230 (92.7%)	427 (86.1%)	2.07 (1.20-3.55) ^e	2.05 (1.18-3.56) ^f	2.08 (1.13-3.83) ^f
CT	18 (7.3%)	69 (13.9%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
CC	0	0			
T allele	478 (96.4%)	923 (93.0%)	1.99 (1.17-3.37) ^f	1.85 (1.06-2.87) ^f	1.64 (0.99-2.74)
C allele	18 (3.6%)	69 (7.0%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
GSTM2 genotypes					
TT	20 (8.2%)	12 (2.6%)	3.58 (1.72-7.46) ^d	4.11 (1.85-9.14) ^d	3.76 (1.50-9.46) ^e

AT	28 (11.5%)	54 (11.5%)	1.11 (0.69-1.81)	1.11 (0.66-1.86)	1.54 (0.86-2.73)
AA	195 (80.3%)	402 (85.9%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
T allele	68 (14.0%)	78 (8.3%)	1.79 (1.27-2.53) ^e	1.66 (1.21-2.27) ^f	1.80 (1.26-2.56) ^e
A allele	418 (86.0%)	858 (91.7%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)

BIM genotypes

-/-	0	7 (1.4%)			
-/+	44 (17.5%)	69 (13.8%)	1.31 (0.87-1.98)	1.32 (0.88-1.98)	1.45 (0.92-2.28)
+/+	207 (82.5%)	424 (84.8%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)
- allele	44 (8.8%)	83 (8.3%)	1.06 (0.73-1.56)	1.05 (0.75-1.47)	1.09 (0.77-1.55)
+ allele	458 (91.2%)	917 (91.7%)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)	1.00 (ref.)

^aData were calculated by unconditional logistic regression; ^bData were matched by age and gender, calculated by conditional logistic regression; ^cMatched data were calculated by conditional logistic regression and adjusted for pack-years of smoking, green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^dP<0.001; ^e0.001<P<0.01; ^f0.01<P<0.05.

Table 3. The Joint Effects of Cigarette Smoking with *DNMT1* +32204 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Smoking status				Pack-years of smoking					
	Never smokers		Current and ever smokers		0		1-39		≥40	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN N	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT1</i> +32204 genotypes										
AA	40/114	1.24 (0.62-2.48)	46/48	7.18 (3.33-15.48) ^b	40/114	1.24 (0.62-2.47)	17/17	5.98 (2.33-15.32) ^c	29/31	7.90 (3.39-18.37) ^b
AG	62/172	1.26 (0.66-2.41)	57/76	5.95 (2.83-12.49) ^b	62/172	1.27 (0.66-2.42)	26/40	4.97 (2.14-11.54) ^c	31/36	6.77 (3.01-15.21) ^b
GG	11/46	1.00 (ref.)	16/34	4.02 (1.52-10.66) ^c	11/46	1.00 (ref.)	6/15	2.60 (0.69-9.77)	10/19	5.84 (1.72-19.85) ^c
AA	40/114	0.81 (0.25-2.58)	46/48	2.16 (0.57-8.25)	40/114	0.81 (0.25-2.58)	17/17	-	29/31	13.47 (0.41-447.89)
AG	62/172	1.01 (0.30-3.43)	57/76	1.24 (0.31-4.96)	62/172	1.01 (0.30-3.43)	26/40	2.35 (0.04-153.04)	31/36	3.46 (0.15-81.07)
GG	11/46	1.00 (ref.)	16/34	1.00 (ref.)	11/46	1.00 (ref.)	6/15	1.00 (ref.)	10/19	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=2.09$ (2 df); P=0.35					$\chi^2=3.02$ (4 df); P=0.55				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^b $P < 0.001$; ^c $0.001 < P < 0.01$; ^d $0.01 < P < 0.05$.

Table 4. The Joint Effects of Green Tea Consumption with *DNMT1* +32204 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Drinking status				Drinking duration in years					
	Drinkers		No drinkers		>10		≤0		0	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT1</i> +32204 genotypes										
AA	30/74	1.14 (0.35-3.72)	56/97	2.01 (0.68-5.90)	20/42	1.34 (0.32-5.61)	10/32	0.52 (0.10-2.63)	56/97	1.85 (0.55-6.21)
AG	30/79	1.11 (0.34-3.62)	86/170	1.71 (0.60-4.84)	9/46	0.47 (0.09-2.36)	21/33	1.49 (0.36-6.19)	86/170	1.49 (0.45-4.98)
GG	6/24	1.00 (ref.)	23/55	1.17 (0.35-3.89)	2/8	1.00 (ref.)	4/16	0.51 (0.04-7.13)	23/55	0.99 (0.26-3.76)
AA	30/74	1.90 (0.83-4.34)	56/97	1.29 (0.81-2.05)	20/42	4.01 (0.93-17.30)	10/32	1.18 (0.40-3.48)	56/97	1.29 (0.81-2.05)
AG	30/79	1.78 (0.78-4.07)	86/170	1.14 (0.73-1.78)	9/46	1.72 (0.37-7.98)	21/33	1.81 (0.67-4.87)	86/170	1.14 (0.73-1.78)
GG	6/24	1.00 (ref.)	23/55	1.00 (ref.)	2/8	1.00 (ref.)	4/16	1.00 (ref.)	23/55	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=4.48$ (2 df); P=0.11					$\chi^2=4.56$ (4 df); P=0.34				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for pack-years smoked, exposure to cooking fume, and family history of lung cancer.

Table 5. The Joint Effects of Cigarette Smoking with *DNMT1* +14395 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Smoking status				Pack-years of smoking					
	Never smokers		Current and ever smokers		0		1-39		≥40	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT1</i> +14395 genotypes										
TT	69/164	1.37 (0.41-4.55)	68/75	7.24 (2.00-26.21) ^c	69/164	1.22 (0.41-3.60)	34/37	7.66 (1.97-29.82) ^c	34/38	3.12 (0.95-10.27)
CT	36/165	0.47 (0.15-1.54)	42/69	5.12 (1.34-19.64) ^d	36/165	0.53 (0.18-1.53)	13/33	1.23 (0.29-5.21)	29/36	7.79 (1.93-31.51) ^c
CC	7/18	1.00 (ref.)	9/17	10.53 (1.91-58.05) ^c	7/18	1.00 (ref.)	2/5	1.12 (0.07-17.83)	7/12	12.68 (2.08-77.25) ^c
TT	69/164	1.57 (0.32-7.72)	68/75	0.43 (0.11-1.67)	69/164	1.57 (0.32-7.72)	34/37	-	34/38	0.57 (0.08-4.25)
CT	36/165	0.30 (0.06-1.41)	42/69	0.30 (0.07-1.31)	36/165	0.30 (0.06-1.41)	13/33	-	29/36	2.26 (0.09-58.56)
CC	7/18	1.00 (ref.)	9/71	1.00 (ref.)	7/18	1.00 (ref.)	2/5	1.00 (ref.)	7/12	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=2.09$ (2 df); P=0.35				$\chi^2=3.02$ (4 df); P=0.55					

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^bp<0.001; ^c0.001<P<0.01; ^d0.01<P<0.05.

Table 6. The Joint Effects of Green Tea Consumption with *DNMT1* +14395 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Drinking status				Drinking duration in years					
	Drinkers		No drinkers		>10		≤0		0	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT1</i> +14395 genotypes										
TT	39/103	0.73 (0.22-2.41)	98/136	1.92 (0.64-5.76)	14/52	0.82 (0.20-3.32)	25/51	0.98 (0.26-3.79)	98/136	2.30 (0.71-7.45)
CT	24/63	0.81 (0.22-2.92)	54/171	0.82 (0.28-2.38)	15/35	1.48 (0.33-6.72)	9/28	0.60 (0.12-2.90)	54/171	0.97 (0.31-3.09)
CC	3/16	1.00 (ref.)	13/19	1.60 (0.39-6.56)	2/13	1.00 (ref.)	1/3	5.00 (0.24-103.46)	13/19	1.97 (0.45-8.61)
TT	39/103	1.82 (0.63-5.26)	98/136	0.98 (0.57-1.67)	14/52	2.44 (0.55-10.79)	25/51	1.06 (0.25-4.50)	98/136	0.98 (0.57-1.67)
CT	24/63	1.91 (0.68-5.38)	54/171	0.57 (0.32-1.01)	15/35	2.68 (0.61-11.88)	9/28	0.71 (0.15-3.39)	54/171	0.57 (0.32-1.01)
CC	3/16	1.00 (ref.)	13/19	1.00 (ref.)	2/13	1.00 (ref.)	1/3	1.00 (ref.)	13/19	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=15.04$ (2 df); P=0.0005					$\chi^2=12.29$ (4 df); P=0.02				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for pack-years smoked, exposure to cooking fume, and family history of lung cancer.

Table 7. The Joint Effects of Cigarette Smoking with *DNMT3A* -448 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Smoking status				Pack-years of smoking					
	Never smokers		Current and ever smokers		0		1-39		≥40	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN N	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT3A</i> -448 genotypes										
GG	0/3	-	3/0	-	0/3	-	3/0	-	0/0	-
GA	17/31	1.39 (0.54-3.58)	12/19	17.25 (3.64-81.70) ^b	17/31	1.56 (0.68-3.58)	8/6	15.58 (2.57-94.38) ^c	4/13	5.22 (0.71-38.40)
AA	97/313	1.00 (ref.)	104/143	6.22 (3.23-11.96) ^b	97/313	1.00 (ref.)	38/69	2.86 (1.36-6.02) ^c	66/74	5.20 (2.71-9.97) ^b
GG	0/3	-	3/0	-	0/3	-	3/0	-	0/0	--
GA	17/31	0.77 (0.25-2.44)	12/19	1.80 (0.35-9.36)	17/31	0.77 (0.25-2.44)	8/6	11.11 (0.25-496.82)	4/13	0.67 (0.04-11.78)
AA	97/313	1.00 (ref.)	104/143	1.00 (ref.)	97/313	1.00 (ref.)	38/69	1.00 (ref.)	66/74	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=3.56$ (2 df); P=0.17					$\chi^2=8.57$ (3 df); P=0.04				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^bp<0.001; ^c0.001<P<0.01.

Table 8. The Joint Effects of Green Tea Consumption with *DNMT3A* -448 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Drinking status				Drinking duration in years					
	Drinkers		No drinkers		>10		≤0		0	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT3A</i> -448 genotypes										
GG	0/0	-	3/3	3.88 (0.40-37.95)	0/0	-	0/0	-	3/3	4.04 (0.40-41.21)
GA	12/23	2.38 (0.76-7.47)	17/27	2.82 (1.07-7.42) ^b	7/14	1.37 (0.28-6.64)	5/9	4.92 (0.88-27.43)	17/27	2.94 (0.99-8.71) ^c
AA	54/160	1.00 (ref.)	147/296	1.79 (1.06-3.02) ^b	24/87	1.00 (ref.)	30/73	1.07 (0.44-2.64)	147/296	1.84 (0.94-3.61)
GG	0/0	-	3/3	0.79 (0.24-2.68)	0/0	-	0/0	-	3/3	0.79 (0.24-2.68)
GA	12/23	1.26 (0.66-2.43)	17/27	1.29 (0.77-2.17)	7/14	1.84 (0.77-4.36)	5/9	0.66 (0.23-1.90)	17/27	1.29 (0.77-2.17)
AA	54/160	1.00 (ref.)	147/296	1.00 (ref.)	24/87	1.00 (ref.)	30/73	1.00 (ref.)	147/296	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=2.47$ (2 df); P=0.12					$\chi^2=0.91$ (4 df); P=0.91				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for pack-years smoked, exposure to cooking fume, and family history of lung cancer. ^b0.01<P<0.05; ^cP=0.0522.

Table 9. The Joint Effects of Cigarette Smoking with *DNMT3B* -149 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Smoking status				Pack-years of smoking					
	Never smokers		Current and ever smokers		0		1-39		≥40	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT3B</i> -149 genotypes										
TT	103/298	0.73 (0.28-1.91)	116/138	6.98 (2.33-20.90) ^b	103/298	0.82 (0.36-1.87)	50/62	4.14 (1.48-11.56) ^c	66/76	5.82 (2.09-16.26) ^b
CT	12/54	1.00 (ref.)	2/22	0.22 (0.02-3.07)	12/54	1.00 (ref.)	0/10	-	2/12	0.40 (0.04-4.11)
TT	103/298	2.13 (0.63-7.21)	116/138	4.12 (0.40-42.97)	103/298	2.13 (0.63-7.21)	50/62	-	66/76	1.00 (0.02-66.84)
CT	12/54	1.00 (ref.)	2/22	1.00 (ref.)	12/54	1.00 (ref.)	0/10	1.00 (ref.)	2/12	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=8.90$ (1 df); P=0.003					$\chi^2=11.20$ (2 df); P=0.004				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^bp<0.001; ^c0.001<P<0.01.

Table 10. The Joint Effects of Green Tea Consumption with *DNMT3B* -149 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Drinking status				Drinking duration in years					
	Drinkers		No drinkers		>10		≤0		0	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
<i>DNMT3B</i> -149 genotypes										
TT	63/151	2.44 (0.64-9.29)	156/285	3.76 (1.04-13.58) ^b	29/77	1.90 (0.29-12.71)	34/74	2.64 (0.40-17.34)	156/285	3.45 (0.58-20.56)
CT	4/34	1.00 (ref.)	10/42	2.38 (0.53-10.75)	2/24	1.00 (ref.)	2/10	0.85 (0.07-10.33)	10/42	2.18 (0.31-15.16)
TT	63/151	2.54 (0.91-7.09)	156/285	1.65 (0.86-3.14)	29/77	2.35 (0.55-10.06)	34/74	1.59 (0.38-6.73)	156/285	1.65 (0.86-3.14)
CT	4/34	1.00 (ref.)	10/42	1.00 (ref.)	2/24	1.00 (ref.)	2/10	1.00 (ref.)	10/42	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=0.02$ (1 df); P=0.89					$\chi^2=0.91$ (2 df); P=0.63				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for pack-years smoked, exposure to cooking fume, and family history of lung cancer; ^b0.01<P<0.05.

Table 11. The Joint Effects of Cigarette Smoking with GSTM2 Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Smoking status				Pack-years of smoking					
	Never smokers		Current and ever smokers		0		1-39		≥40	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
GSTM2 genotypes										
TT	12/9	4.94 (1.16-15.66) ^c	8/3	12.81 (2.96-55.52) ^b	12/9	5.15 (1.60-16.62) ^c	3/1	22.44 (1.70-296.83) ^d	5/2	9.45 (1.68-53.27) ^d
TA	14/39	1.16 (0.54-2.52)	14/15	8.26 (3.21-21.24) ^b	14/39	1.20 (0.55-2.63)	10/9	11.20 (3.72-33.72) ^b	4/6	3.74 (0.74-18.77)
AA	84/273	1.00 (ref.)	111/129	5.44 (3.31-8.96) ^b	84/273	1.00 (ref.)	37/58	3.81 (2.03-7.14) ^b	74/71	6.89 (3.96-11.99) ^b
TT	12/9	7.35 (1.56-34.63)	8/3	2.40 (0.39-14.77)	12/9	7.35 (1.56-34.63)	3/1	-	5/2	-
TA	14/39	0.92 (0.37-2.29)	14/15	1.21 (0.47-3.09)	14/39	0.92 (0.37-2.29)	10/9	3.26 (0.56-19.27)	4/6	0.72 (0.06-8.77)
AA	84/273	1.00 (ref.)	111/129	1.00 (ref.)	84/273	1.00 (ref.)	37/58	1.00 (ref.)	74/71	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=0.18$ (2 df); P=0.92					$\chi^2=3.65$ (4 df); P=0.46				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^bp<0.001; ^c0.001<P<0.01; ^d0.01<P<0.05.

Table 12. The Joint Effects of Green Tea Consumption with *GSTM2* Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Drinking status				Drinking duration in years					
	Drinkers		No drinkers		>10		≤0		0	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
GSTM2 genotypes										
TT	3/5	1.90 (0.35-10.27)	17/7	13.65 (3.78-49.31) ^b	3/5	1.23 (0.08-19.32)	24/75	3.36 (0.37-30.23)	17/7	16.54 (4.33-63.19) ^b
TA	14/15	4.05 (1.76-9.28) ^b	14/39	1.57 (0.71-3.50) ^b	14/15	5.70 (1.98-16.40) ^c	4/6	3.46 (0.84-14.22)	14/39	1.83 (0.77-4.33)
AA	41/146	1.00 (ref.)	154/256	2.23 (1.47-3.38)	41/146	1.00 (ref.)	2/3	1.43 (0.72-2.81)	154/256	2.60 (1.54-6.39) ^b
TT	3/5	1.87 (0.57-6.18)	17/7	1.76 (1.06-2.93) ^d	3/5	1.90 (0.23-15.57)	24/75	1.81(0.41-7.98)	17/7	1.76 (1.06-2.93) ^c
TA	14/15	2.32 (1.25-4.30) ^c	14/39	0.83 (0.48-1.44)	14/15	2.77 (1.23-6.22)	4/6	2.08 (0.68-6.37)	14/39	0.83 (0.48-1.44)
AA	41/146	1.00 (ref.)	154/256	1.00 (ref.)	41/146	1.00 (ref.)	2/3	1.00 (ref.)	154/256	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=8.12$ (2 df); P=0.02					$\chi^2=12.05$ (4 df); P=0.02				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for pack-years smoked, exposure to cooking fume, and family history of lung cancer; ^bp<0.001; ^c0.001<P<0.01; ^d0.01<P<0.05.

Table 13. The Joint Effects of Cigarette Smoking with BIM Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Smoking status				Pack-years of smoking					
	Never smokers		Current and ever smokers		0		1-39		≥40	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
BIM genotypes										
-/-	0/4	-	0/3	-	0/4	-	0/0	-	0/3	-
-/+	24/25	2.18 (1.20-3.98) ^d	20/24	5.59 (2.61-11.99) ^b	24/45	2.22 (1.22-4.06) ^c	5/8	3.26 (0.95-11.25)	15/16	7.41 (2.96-18.55) ^b
+/+	91/293	1.00 (ref.)	116/131	6.80 (4.00-11.57) ^b	91/293	1.00 (ref.)	47/67	5.47 (2.93-10.22) ^b	69/64	8.11 (4.51-14.58) ^b
-/-	0/4	-	0/3	-	0/4	-	0/0	-	0/3	-
-/+	24/25	1.61 (0.82-3.17)	20/24	0.48 (0.21-1.12)	24/45	1.61 (0.82-3.17)	5/8	-	15/16	0.78 (0.21-2.90)
+/+	91/293	1.00 (ref.)	116/131	1.00 (ref.)	91/293	1.00 (ref.)	47/67	1.00 (ref.)	69/64	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=3.30$ (2 df); P=0.19					$\chi^2=3.68$ (3 df); P=0.30				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for green tea consumption, exposure to cooking fumes, and family history of lung cancer; ^bp<0.001; ^c0.001<P<0.01; ^d0.01<P<0.05.

Table 14. The Joint Effects of Green Tea Consumption with BIM Genotypes for Lung Cancer Risk

Variables	Drinking status				Drinking duration in years					
	Drinkers		No drinkers		>10		≤0		0	
	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a	CA/CN	OR (95% CI) ^a
BIM genotypes										
-/-	0/3	-	0/4	-	0/2	-	0/1	-	0/4	-
-/+	10/27	1.20 (0.52-2.78)	34/42	2.78 (1.50-5.14) ^b	6/18	1.00 (0.34-3.19)	4/9	1.90 (0.48-7.42)	34/42	2.99 (1.43-6.27) ^b
+/+	50/149	1.00 (ref.)	157/275	1.91 (1.25-2.91) ^b	23/69	1.00 (ref.)	27/80	1.13 (0.56-2.26)	157/275	2.04 (1.15-3.63) ^c
-/-	0/3	-	0/4	-	0/2	-	0/1	-	0/4	-
-/+	10/27	1.13 (0.56-2.26)	34/42	1.16 (0.79-1.68)	6/18	1.05 (0.42-2.63)	4/9	1.24 (0.42-3.64)	34/42	1.16 (0.79-1.68)
+/+	50/149	1.00 (ref.)	157/275	1.00 (ref.)	23/69	1.00 (ref.)	27/80	1.00 (ref.)	157/275	1.00 (ref.)
Test for interaction	$\chi^2=0.67$ (2 df); P=0.71					$\chi^2=0.08$ (4 df); P=1.00				

^aData were matched by age and gender, calculated by (exact) conditional logistic regression and adjusted for pack-years smoked, exposure to cooking fume, and family history of lung cancer; ^b0.001<P<0.01; ^c0.01<P<0.05.

科技部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（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）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），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

抽菸所導致的肺癌是世界各地的重要公共衛生議題，並且抽菸會促使腫瘤抑制基因過度甲基化而容易引起癌症的發展；針對抽菸所可能相關的表觀遺傳來進一步地探討，將有助於更加理解其致癌機轉。另一方面，綠茶可能抑制 DNA 甲基轉移酶與腫瘤抑制基因表現，進而降低癌症的發生；此外，DNA 甲基轉移酶與腫瘤抑制基因本身的基因型亦有可能影響其基因之表現。更進一步地，miR-29b 之表現也可能影響 DNA 甲基轉移酶之表現。相信我們的整體結果，將對於肺癌發展之可能機制提供進一步的瞭解。

參加第十九屆國際AEK癌症大會

(19th International AEK Cancer Congress) 出國報告

本人於過去多次參加世界頂級的癌症研討會，由於在會議中所學到的知識不僅對於研究的邏輯思考以及實驗技巧的修正都有極大的收穫，於是再次提出申請參加世界頂級的癌症專家會議--第十九屆國際AEK癌症大會 (19th International AEK Cancer Congress)。

由德國癌症協會 (Deutsche Krebsgesellschaft)、德國癌症援助 (the German Cancer Aid, Deutsche Krebshilfe) 和德國研究基金會 (Deutsche Forschungsgemeinschaft) 提供財政協助而舉辦第十九屆國際AEK癌症大會，於今年 (2017年) 3月1日至3日在德國海德堡 (Heidelberg) 召開；這是德國癌症協會 (Germany Cancer Society) 的實驗癌症研究部 (Abteilung Experimentelle Krebsforschung) 與其他國家的癌症研究人員共同聚會的中心型會議，每兩年舉辦一次，主要是討論癌症之基礎和轉譯研究的最新發展，而本次會議的重點在於 (1) 對於DNA損傷和修復途徑的治療開發、(2) 關於RAS的新概念、(3) 自噬和泛素相依訊息 (Autophagy & Ubiquitin-dependent signaling)、(4) 標靶轉錄和MYC、(5) 重新審視程序性細胞死亡、(6) 腫瘤異質性與癌症進展、(7) 精準腫瘤學：從實驗桌到病床邊、(8) 針對癌症的精準醫療 (precision medicine)。

大會是在位於海德堡的「歐洲分子生物學實驗室 (European Molecular Biology Laboratory, EMBL)」所舉行。我在細雨中，延蜿蜒山路，途經若干美麗莊園，轉車至此；若未拜現代手機通訊與衛星定位的科技運用，恐怕不熟悉之人是難以尋覓至此。「歐洲分子生物學實驗室」是由歐盟會員國資助而創建，總部

就設立在海德堡，在英國Hinxton、法國格勒諾布爾 (Grenoble)、德國漢堡 (Hamburg)、以及義大利蒙泰羅通多 (Monterotondo) 亦設有分處。「歐洲分子生物學實驗室」的目的即在進行分子生物學和分子醫學的基礎研究，培訓科學人才，並且發行知名的分子生物學期刊《Euroean Molecular Biology Organization (EMBO)》。走入主體以雙螺旋為前進概念、氫鍵為連繫之橋的建築中，建築物裡的每間辦公室與實驗室皆可見及外部景象。對於絕大多數於歐洲的癌症研究學者而言，此研究中心所提供的訊息是最有價值、具權威、與顯現公正的參考資源，並且此處已經為許多國家的癌症研究發展作出了重大貢獻。

在關於精準醫療的討論會議中，大家皆認同須要考量個體之差異性，並且藉此提出預防和治療策略；而透過近年來大規模的生物數據庫（例如人類基因組序列）之發展，再搭配蛋白體學、代謝體學，基因體學、以及多種細胞檢測技術，推廣此一概念的前景已經大大獲得改善。而現在需要的是更廣泛的研究計劃，鼓勵創新的研究方法，並且嚴格測試，最終將結果運用於建構臨床實踐所需的證據基礎。特別地是，癌症是常見疾病，它也是眾多國家和全球死亡的主因之一；隨著人口的增長，其發病率也在增加。研究已經揭示了驅動癌症的許多分子變化，顯示每個癌症都有自己的基因組特徵，亦具有一些腫瘤特異性；因此，在未來的癌症診斷上，除了倚靠傳統的病理組織檢查以外，尚且應當加入分子檢驗，原因是即使為相同的病理型態，其分子型態卻可能有所不同。也就是說，雖然癌症在很大程度上是在生命中累積基因組損傷的結果，而分子變異有助於癌症的發展危險；對於這種致癌機制的認識已經開始影響著健康風險評估、診斷類別甚至是治療策略，包括由此發展出針對性的治療方法，例如許多標靶療法可以賦予其益處。然而，意識到這些現象，也反映出須要更加努力地了解癌症，並且發展更多

準確的分子診斷工具；此外，我們也將須要分析更多與癌症有關的基因。當然，為了加速推展精準醫療，我們需要更多的臨床試驗，對於病患進行更可靠的臨床檢測模式。不過，我們也要認知到，以癌症為重點的精準醫療，必然會面臨一些障礙，包括不明原因的抗藥性、腫瘤相關基因的異質性、如何監測反應、對於腫瘤復發之機制有所不解、還有對於藥物組合運用的知識不足。此外，即使針對精準醫療的新式研究設計被提出，不論是將某種靶點明確的藥物視為一個籃子，而將帶有相同標靶基因的不同癌症放進一個籃子裡進行研究的「籃子研驗 (Basket Trial)」，或者是如同撐起一把大傘，把某一種癌症有關的各種基因都攏聚在一起，也就是將不同的標靶檢測在同一時間裡完成，然後根據不同的標靶基因分配不同的精準標靶藥物的「傘式試驗 (Umbrella Trial)」，我們都須要加以了解如此研究的效能，還有需要的樣本數目，甚至在應用中會遇到的挑戰。而本人於此次會議所發表的研究題目是「抽菸、綠茶飲用、BIM基因多形性對於肺癌發展之效應 (Effects of cigarette smoking, green tea consumption, and BIM genetic polymorphism on lung cancer development)」，歸類於Therapeutic exploitation of DNA damage & repair pathways。吸菸可以增加DNA甲基化的穩定性、腫瘤抑制基因的高度甲基化以及致癌物質的敏感性，從而發展出肺癌。茶多酚是強抗氧化劑，而綠茶可以抑制DNA甲基轉移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的表現。作為腫瘤抑制基因，細胞死亡之BCL-2交互作用調節者 (BCL-2 interacting mediator of cell death, BIM) 可以因為被高度甲基化而默化。然而，目前並不知道BIM多形性與肺癌發生危險之間是否存在相關，特別是在不同的吸菸和綠茶飲用狀態中。因此，我們設計了一個以醫院為基礎的病例對照研究，以評估吸菸，綠茶飲用和BIM基因多形性對於肺癌發生危險的影響。我們的結果顯示，飲用綠茶

的吸菸者其肺癌危險性是增加的。相較於攜帶BIM +/+基因型的非吸菸者，攜帶BIM +/+基因型的吸菸者具有顯著較高的肺癌危險性。此外，相較於攜帶BIM +/+基因型的綠茶飲用者，攜帶BIM +/+基因型的非綠茶飲用者亦具有顯著較高的肺癌危險性，並且綠茶飲用與BIM基因型對肺癌發生危險的交互作用是明顯的。我們的研究表明，BIM +/+基因型可能促進吸菸相關的肺癌發展，並且修飾綠茶對於肺癌的預防作用。

本次與會，聽取歐洲學者對於癌症的最新研究成果，最大的收穫是感受到各國學者對於人類癌症的學術貢獻，以及各方研究組織對於人類癌症研究的合作努力。現今，癌症仍然是一個全球性的健康問題；隨著人口的增加以及平均餘命的延長，每年的癌症病例將會持續上升，特別是在發展中國家，而各國之間也仍然具有特殊性的差異。儘管人類在癌症探討方面的顯著成就，我們在醫療保健和公共衛生環境下對於癌症的發生、病因和預防途徑所投入的工作，例如以證據為基礎的預防和治療規範、計劃和介入仍然存在的差距；因此，我們須要努力的地方還很多。如何將科學落實在社會，這是一項相對較新的任務；將研究成果轉移至日常生活中去實踐，並且讓民眾瞭解，更進一步地加以促進其健康，如此才是改善群體健康的正確途徑。在會議中，許多學者也彼此交流著，如何將癌症的研究成果落實到各種健康保健，並且在公共衛生的環境中加以應用；其中包括了探討理論框架、研究的實施方式、以及衍生的相關倫理問題。此外，由於對於基因體的了解，現在可以進行一些以前做不到的事，或許是尋找新的致癌或預防途徑。

這次的會議行程豐富、內容精采，對於本人在研究思路的拓廣、研究的進行及實驗之計畫都有莫大助益。最後建議，希望科技部或教育部應當多鼓勵研究

學者參加大型國際學術會議，並且給予較多的資源，也給予研究生更寬裕的補助
考量。此舉不僅能吸收新知，更能拓幫助台灣拓展國際關係。

攜回資料：會議論文摘要。

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：翁瑞宏		計畫編號：104-2314-B-040-004-MY2				
計畫名稱：抽菸、綠茶飲用與微型核糖核酸-29b對於DNA甲基轉移酶表現、腫瘤抑制基因（GSTM2與BIM）甲基化以及肺癌發展之效應						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇		
		研討會論文	0			
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利	0		
		商標權	0			
		營業秘密	0			
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
	技術移轉	件數	0	件		
		收入	0	千元		
國外	學術性論文	期刊論文	1	篇	1. (accept)DNA Methyltransferase 3B-149 Genetic Polymorphism Modulates the Lung Cancer Risk from Smoking	
		研討會論文	4		1. Huang CC, Lai CY, Tsai CH, Wang JY, Wong RH. 2017/03. Combined effects of cigarette smoking, DNA methyltransferase 3B genetic polymorphism, and DNA damage on lung cancer. Heidelberg Germany. 19th International Abteilung Experimentelle Krebsforschung Cancer Congress, 2017. 2. Wong RH, Huang CC, Kuo YC, Chen YJ, Lai CY, Tsai CH, Wang JY. 2017/03. Effects of cigarette smoking, green tea consumption, and BIM genetic polymorphism on lung cancer development. Heidelberg Germany. 19th International	

					Abteilung Experimentelle Krebsforschung Cancer Congress, 2017. 3. Wong RH, Huang CC, Lai CY, Lam KL, Tsai CH, Wang JY. 2016/06. Effects of cigarette smoking, green tea consumption, microRNA-29b, and its target DNMT3B on lung cancer development. Lyon France, WHO Global Cancer: Occurrence, Causes, and Avenues to Prevention, 2016. 4. Huang CC, Lai CY, Tsai CH, Wang JY, Chen YY, Cai YW, Wong RH. 2016/06. DNA methyltransferase 3B - 149 genetic polymorphism modulates the risk of lung cancer elicited by smoking. Lyon France, WHO Global Cancer: Occurrence, Causes, and Avenues to Prevention, 2016.
	專書		0	本	
	專書論文		0	章	
	技術報告		0	篇	
	其他		0	篇	
智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
			已獲得	0	
		新型/設計專利	0		
	商標權		0		
	營業秘密		0		
	積體電路電路布局權		0		
	著作權		0		
	品種權		0		
	其他		0		
技術移轉	件數		0	件	
	收入		0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	6	人次	黃馨誼、劉奕均、郭奕均、涂怡君、邵宣文、蔣昀宸
		碩士生	2		林玟君、陳雅君
		博士生	1		黃家禎
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		

	博士後研究員	0	
	專任助理	0	
<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(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>			

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）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（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

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200字為限）

已發表一篇、其餘發表中與撰寫中。

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）

抽菸所導致的肺癌是世界各地的重要公共衛生議題，並且抽菸會促使腫瘤抑制基因過度甲基化而容易引起癌症的發展；針對抽菸所可能相關的表觀遺傳來進一步地探討，將有助於更加理解其致癌機轉。另一方面，綠茶可能抑制DNA 甲基轉移酶與腫瘤抑制基因表現，進而降低癌症的發生；此外，DNA 甲基轉移酶與腫瘤抑制基因本身的基因型亦有可能影響其基因之表現。更進一步地，miR-29b 之表現也可能影響DNA 甲基轉移酶之表現。相信我們的整體結果，將對於肺癌發展之可能機制提供進一步的瞭解。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）