

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

環境暴露與人類乳突瘤病毒感染交互作用與台灣不抽煙肺癌形成之相關性(第3年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-010-MY3
執行期間：99年08月01日至100年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：鄭雅文
共同主持人：李輝
計畫參與人員：學士級-專任助理人員：林婉茹

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 100年10月26日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

環境暴露與人類乳突瘤病毒感染交互作用與

台灣不抽煙肺癌形成之相關性

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-010-MY3
執行期間：97年08月01日至 100年07月31日

計畫主持人：鄭雅文
共同主持人：李輝
計畫參與人員：林婉茹

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學研究所

目 錄

中文摘要	3
Abstract	4
文獻綜論	5
方法	15
結果與討論	22
參考文獻	25
表	36
圖	39

中文摘要

過去對於肺癌的研究大多著重於抽菸所引起的腫瘤化機制，少有不抽菸肺癌之研究，本研究大膽推測台灣不抽菸女性肺癌患者，有高含量之 DNA 鍵結物堆積，又有高頻率之 HPV16/18 感染，可能會經由促進染色體不穩定 (chromosomal instability, CIN) 發生之頻率增加導致肺癌形成。本研究利用本研究室已建立的三株具有 HPV16 E6 不同表現量以及 12 株沒有 HPV 感染的肺腺癌細胞株，以低劑量 B[a]P 長期處理後，以 FISH 方法偵測 micronuclei 的發生頻率，以推測 CIN 發生的程度，結果發現 HPV 感染之細胞經過 B[a]P 處理，比 HPV 未感染之肺癌細胞株有較多的 micronuclei 的形成但與 E6 表現量無統計上的相關性。但在 HPV 感染與 HPV 沒有感染的肺癌細胞分別以 RNAi 和轉染技術大量表現或剔除 E6 之表現時，發現 micronuclei 的發生頻率會因 E6 被剔除而減少，亦會因轉染入 E6 蛋白而增加其 micronuclei 的發生頻率。因此，根據上述結果認為 CIN 發生是不僅與 HPV16/18 DNA 之嵌入有關亦會因 E6 蛋白表現而增加。本研究更進一步分析 hMLH1、hMLH2、XRCC1、XRCC3、XRCC5、BRCA1 和 BRCA2 等基因及蛋白的表現及其甲基化情形，結果發現僅 XRCC3 及 XRCC5 的基因表現有受到抑制。而在肺腫瘤組織的分析結果也發現 XRCC3 蛋白在 adduct high/HPV E6+ 組的表現率顯著低於 adduct high/HPV E6-、adduct low/HPV E6+ 及 adduct low/HPV E6- 三組。進一步分析其基因座異質性缺失，本研究選定在子宮頸癌的研究中發現與 HPV 感染有關的 myc 基因及 hTERT 基因做進一步分析。結果發現環境汙染物與 HPV 的交互作用會造成基因體不穩定而活化 c-myc 的表現進而促使其活化 hTERT 而造成肺細胞的腫瘤化，因此，c-myc 基因在 HPV 造成的肺腫瘤化過程可能扮演重要角色。

本計畫的研究成果發現環境汙染物暴露和 HPV 感染之交互作用，會經由抑制 XRCC3 及 XRCC5 修補基因的表現而增加染色體不穩定頻率，並進而導致 hTERT 及 c-myc 基因的活化而參與不抽菸者肺癌的形成，尤其是台灣不抽菸婦女的肺癌形成。

關鍵字：肺癌，人類乳突瘤病毒

ABSTRACT

Molecular mechanisms of lung carcinogenesis is predominately focused on cigarette smoke-induced lung cancer, few information is obtained from studies of nonsmoking lung cancer until now. We thus hypothesized that the combined effects of accumulated DNA damage and HPV infection could synergistically increase chromosomal instability occurrence to cause lung tumor formation. In this project, 3 HPV-infected and 12 non-infected lung cancer cells, which have been established from pleural effusions of lung cancer patients, were treated with various doses of B[a]P for various time intervals, and then the frequency of micronuclei were determined by FISH analysis. The micronuclei number induced by B[a]P in HPV-infected lung cancer cells were frequently than in non-infected lung cancer cells but not correlated with the levels of HPV 16 E6 protein. In addition, the micronuclei formation were increased and decreased in E6- negative or-positive cells after transfect or knockdown HPV 16 E6 expression. Therefore, we considered that the CIN not only correlated with HPV intergradation but also with HPV 16 E6 oncoprotein expression. In addition, we also found that the expression levels of XRCC3 and XRCC5 gene and protein in B[a]P treated HPV+ lung cancer cells were significantly lower than in HPV- cells. In lung tumor tissues, the XRCC3 and XRCC5 expression in adduct high/HPV+ were significantly lower than in adduct high/HPV-, adduct low/HPV+, and adduct low/HPV- groups. In LOH analysis, we found that the genome instability were caused by environmental exposure and HPV interaction and activated the c-myc protein expression to promote the hTERT gene transcription to involve in lung pathogenesis. Therefore, c-myc may play an important role in HPV-infected lung tumorigenesis. These results obtained from the project were helpful to understand the synergistic effect of environmental carcinogen exposure could contribute to HPV16/18 infected lung tumorigenesis in nonsmokers.

Key words: lung cancer, HPV, genome instability

一、文獻綜論

1. 肺癌的流行病學

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

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

鱗狀上皮癌快。台灣都市與鄉村地區，每人每年香菸平均消費量並無多大差異，但都市地區罹患肺癌之人數顯著高於鄉村地區，因此抽菸行為無法說明都會區民眾為何有較高罹患肺癌之危險性 (Tay et al., 1988)。這些證據均顯示，雖然香菸是引起肺癌的最主要因子。但在台灣可能有其他的環境因子參與不抽菸者之肺癌的形成。

2.環境暴露與肺癌

Benzo(a)pyrene (BaP) 是香菸中主要的致癌物，廣泛存在於汽機車排放物、工廠排放物、廚房油煙及二手煙中 (Yang et al., 2000; Cheng et al., 2003)，屬於多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)。Hall et al. (1990) 研究指出多環芳香烴在生物體內，會經由微粒體單氧化酵素系統或前列腺素 H 合成酵素 (prostaglandin H synthase; PHS) 代謝活化成 epoxide，然後經水合作用轉變為 diols 型的活化最終代謝物，而與 DNA 共價結合形成 DNA 鍵結物。DNA 鍵結物已被認為是造成基因突變，而引發癌症發生的主要化學致癌機轉的基礎 (Dipple et al., 1987)。例如香菸中典型之人類可能致癌物- BaP 的代謝活化過程，主要是經由 cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) 酵素系統代謝活化生成(±)-trans-7,8-dihydroxy-9,10 -dihydrobenzo(a)pyrene，然後再繼續氧化成最終致癌物 anti-7,8-dihydroxy-9,10 -epoxy- 7,8,9,10 tetrahydrobenzo (a)pyrene (BPDE)，此活化代謝產物會直接攻擊 DNA dG 之 N2 位置形成 DNA 鍵結物 (Jeffrey et al., 1976; 1977)。另一個主要代謝路徑是單電子氧化 BaP 產生 radical cation，此產物會攻擊 DNA 的 dG 之 N7 位置，而形成 BPDE-N7-dG 鍵結物 (Cavalieri and Rogan, 1992)。這些代謝路徑和形成之 DNA 鍵結物都在細胞及動物實驗得到證實。例如人類白血球經處理 100 µM BaP，在外加酵素活化下，可產生 1.3 BaP-adducts/10⁸ nucleotides (Roggeband et al., 1993)。Wolterbeek 等 (1993) 以導管直接將 BaP 灌入倉鼠的氣管中，結果發現倉鼠氣管會形成 BaP 的主要 DNA 鍵結物- BPDE-N2-dG (Wolterbeek et al., 1993; Roggeband et al., 1994)。這些 DNA 鍵結物常會導致鹼基配對錯誤而造成基因突變。最近研究發現香菸中之主要致癌物 BaP 會造成 p53 codon 157、158、248、249 及 273 位置發生 G→T 的鹼基更換突變 (base substitution mutation)。而 K-ras codon 12、13 及 61 的突變亦發現與

BPDE -N2-dG 鍵結物有關 (Hussain et al., 2001 ; Husgafvel- Pursiainen et al., 1993; Rodenhuis et al., 1988; Slebos et al., 1991; Westra et al., 1993)。因此香菸中 BaP 致癌物所造成之 BPDE-N2-dG 會引起 p53 和 K-ras 基因突變，是已知由抽菸引起肺癌的主要分子化學致癌機轉。本研究室過去分析肺癌患者肺腫瘤組織及非癌症會者之正常肺組織中 BPDE-like DNA 鍵結物含量時發現肺癌患者肺腫瘤組織中的 DNA 鍵結物含量明顯高於非癌症控制組，且 DNA 鍵結物含量高者其罹患肺癌的危險性亦提高(Cheng et al., 2000)，另外針對肺癌患者加以分析時發現抽菸與不抽菸肺癌患者肺腫瘤組織中的 DNA 鍵結物含量並無差異，顯示暗示不抽煙肺癌患者暴露環境污染物所產生的 DNA 傷害並不低於抽菸者，此外本研究亦發現不抽菸女性肺癌患者肺腫瘤組織中的 DNA 鍵結物含量明顯高於不抽菸男性患者，因此推測女性較男性患者對環境污染物的感受性為強(Cheng et al., 2001)。

3. HPV 與其他癌症的相關研究：

目前有關 HPV 與人類癌症形成之研究，大多來自於子宮頸癌方面的研究。因為有 90% 的子宮頸癌患者有 HPV 的感染，尤其是高危險型之 HPV 16 及 18 (Zur Hausen, 1991)。由 IBSCC (International Biological Study on Cervical Cancer, 1995) 的報告指出，在分析 22 個國家的子宮頸癌患者中，僅有 7.1% 的患者是沒有感染 HPV。其不同型之 HPV 的感染率分別有 HPV 16, 49.9%; HPV 18, 13.7%; HPV 31/33/35, 7.2%; HPV 45, 8.4%，其他型 HPV 有 13.7%，沒有感染者有 7.1%。因此 HPV 感染與子宮頸癌有密切的相關性。但亦有研究指出，子宮頸抹片中細胞表現正常之婦女也有 5-80% 不等的 HPV 感染率，而此感染率在性行為活躍的時期會達到顛峰，之後 HPV 感染率便隨年齡增加而降低，在台灣流行病學的研究中也發現，子宮頸抹片中細胞表現正常的婦女其 HPV 的感染率也有 12.5%，且主要以 HPV 16 為主 (Taso et al., 1994)，而在子宮頸癌患者中有 10% 的患者並沒有感染 HPV，因此 HPV 與子宮頸癌之相關性截至目前為止仍有許多爭議。此外，頭頸部癌症、膀胱癌、食道癌、支氣管癌及肺癌之腫瘤組織中也都發現有 HPV 的感染 (Viola et al., 2001 ; Haled et al., 2001 ; Serraino et al., 2001)，但這些

癌症的形成與 HPV 之間的相關性仍有待釐清。

4. HPV 與肺癌的相關研究：

過去有研究發現高危險性的 HPV 16 及 18 可能在人類癌症的形成過程扮演了重要的角色 (Zur Hausen and Schneider, 1987; Zur Hausen 1991)。大於 90% 的子宮頸癌患者都有 HPV 的感染，尤其是 HPV 16 及 18 (Zur Hausen, 1991)。除了子宮頸癌之外，在膀胱癌、食道癌、支氣管癌，甚至肺癌亦都發現有 HPV 的感染。有關肺癌與 HPV 感染相關性之研究已有一些國家報告過。例如美國 (Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992)，日本 (Szabo et al., 1995; Hirayasu et al., 1996)、芬蘭 (Nouva et al., 1995; Soini et al., 1996)、挪威 (Henning et al., 1999)、法國 (Thomas et al., 1995) 及中國大陸 (Da et al., 1996) 等。他們報告之感染率由 0 - 80 % 不等，其結果整理於 Table 7 中。在美國及法國等國家的報告均指出在肺組織中的 HPV 感染率相當低，甚至測不到 (Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992; Thomas et al., 1995)。但在日本琉球卻有高達 80% 的感染率，且 HPV 感染的患者之存活率卻高於未感染者 (Iwamasa et al., 2000)。而在過去的研究中發現，肺鱗狀上皮細胞癌患者有高達 79% HPV 的感染 (Hirayasu et al., 1996)。亦有研究指出肺腺癌及肺鱗狀上皮細胞癌均可測到 HPV 的感染，且其感染率亦相當接近，肺腺癌有 9%，而肺鱗狀上皮細胞癌有 10% (Kinoshita et al., 1995)。Thomas et al. (1998) 的研究發現，在鱗狀上皮癌及腺細胞癌混合的肺癌患者，HPV 的感染率竟高達 78.3%，且在肺腺癌細胞及其鄰近鱗狀上皮癌細胞均可測到 HPV。由以上之結果得知，HPV 的感染與肺癌之相關性，似乎有人種和地域的關係。而本研究室過去的研究結果也發現年齡不抽煙女性肺癌患者相對於男性及抽菸者有較高的 HPV 16/18 感染率。其 OR 值高達 10.12 (95% CI, 3.88-26.38) (Cheng et al., 2001)。且若血液中可測得 HPV 16 感染者之罹患肺癌之危險性是沒有感染者的 6.5 倍 (95%CI, 3.7-11.3, $P < 0.0001$)。而 HPV 18 則有 9.2 倍 (95% CI, 4.2-20.2, $P < 0.0001$)。若 HPV 16/18 同時感染者則其危險性更高達 75.7 倍 (95%CI, 9.8-582.1, $P < 0.0001$) (Chiou et al., 2003)。因此推測 HPV 16/18 感染可能參與台灣肺癌之形成。

5. 染色體不穩定與癌症形成之相關性

在正常的人類體細胞中，都具有成對的基因(allele)，但是在細胞癌化的過程中，若失去其中一個基因座，這就是所謂的基因座缺失(loss of heterozygosity; LOH)。一般來說，造成 LOH 的情形，可能透過下列各機制的運作：(A) 細胞在進行有絲分裂過程中，染色體發生了不分離的現象(missegregation or non-disjunction)，造成染色體不成對的結果，(B)有絲分裂時，染色體發生重組的現象(recombination)，造成基因座缺失。(C)其中一個基因座發生缺失(deletion)的情形。以上皆是造成 LOH 的可能原因(Cavenee et al., 1983)。LOH 的分析方式是使用廣泛分布在整個染色體中的微衛星序列(microsatellite sequence)，利用其與相鄰近基因的關聯性，間接地偵測與微衛星序列相近的基因座缺失情形。在目前 LOH 的方法已被利用於許多癌症之抑癌基因缺失的偵測，例如：在日本方面，利用 39 個 microsatellite markers 對 79 個乳癌組織進行分析，發現至少有 4 個存在於染色體 13q、16q 及 17p 的抑癌基因缺失，而造成了乳癌的發生 (Sato et al., 1990)；在美國方面利用 70 個 microsatellite markers，針對卵巢癌進行分析，發現在第 6 對染色體上有兩個區域有高度 LOH 的情形，推測此二區域可能有抑癌基因參與了卵巢癌的形成(Cliby et al., 1993)；另外，在法國，Boige et al. (1997)利用 275 個 microsatellite markers 對 48 位肝癌病人進行 LOH 分析，結果顯示在所分析的 39 個染色體臂(chromosome arm)中，有 8 個染色體臂具有高頻率 LOH 的情形，而且染色體 16p 與 1p 及 16p 與 4q 有連鎖性缺失的現象。

6. 染色體不穩定與肺癌發生的相關性

過去有許多在肺癌的研究中都發現有染色體不穩定的現象(Haruki et al., 2001; Balsara and Testa et al., 2002; Tseng et al., 2005)，過去在台灣的研究也指出鱗狀上皮細胞癌患者在 D17S398 及 D3S4545 位置發生基因座異質性缺失(LOH)的頻率高於肺腺癌，抽菸者在 D13S153 位置發生基因座異質性缺失的頻率高於不抽菸者(Ho et al., 2002)，亦有研究指出 16q24、17q22 及 19q13.3 的基因座異質性缺失可能與不抽煙肺腺癌的發生有關，而 7q31、8p23.2、10p14-p15、13q12.3 及 17p13.1-13.3 則在抽煙即不抽煙肺癌患者均發現

其發生 LOH (Wong et al., 2002)。過去 Girard 等人利用 399 個 microsatellite marker 分析肺癌患者的染色體不穩定情形，結果找到 13 個位置與小細胞肺癌有關，7 個位置與非小細胞肺癌有關，2 個位置與小細胞肺癌及非小細胞肺癌均有關，而較常發生 LOH 的位置分別是 7p, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10p, 10q, 13q, 15q, 17p, 18q, 19p, Xp 及 Xq，此結果顯示小細胞肺癌及非小細胞肺癌的基因改變可能不同(Girard et al., 2000)，上述研究結果顯示不同腫瘤形式或是不同抽菸習慣者其染色體發生不穩定的位置可能有其特異性。而染色體的缺失被認為是與修補雙股 DNA 斷裂的修補基因去活化有關(Khanna et al., 2001; Gent DC et al., 2002)，與乳癌形成相關的乳癌腫瘤抑制基因 BRCA1 及 BRCA2 具有與 DNA 傷害所誘發的 Rad51 基因交互作用而參與雙股 DNA 斷裂的修補作用(Chen et al., 1998; Davies et al., 2001)。此外，XRCC5 及 XRCC6 基因亦會與 Ku 70 及 Ku 80 結合而參與雙股 DNA 斷裂的修補作用(Koike et al., 2002)，在 XRCC5 基因缺失的老鼠纖維母細胞中可發現較高頻率的基因不穩定現象(Difilippantonio et al., 2000)，而在台灣的研究中也發現在非小細胞肺癌患者肺腫瘤組織中有較高頻率的染色體不穩定，且可能與 BRCA1、BRCA2 及 XRCC5 基因轉錄起始區發生甲基化而使該基因去活化所致(Lee et al., 2007)。

7. 肺癌之基因座缺失圖譜

肺癌組織在許多染色體區域都有高度變異的情形，但是目前只有少數幾個抑癌基因 (TSGs) 被認為與肺癌的形成有關；因此將對於 NSCLC 形成較重要之染色體其 LOH 與相關之抑癌基因的情形分述如下：

Chromosome 3：

肺癌組織在第 3 對染色體發生 LOH 的頻率約為 89%，其中最主要發生變異的區段為 3p12、3p14.2、3p21 及 3p25。所在的區域包含 FHIT (3p14.2)、RASSF1A(3p21)及 VHL(3p25) 等抑癌基因，而其變異的情形以基因缺失、促進子過度甲基化及蛋白不表現為主(Belinsky et al., 2002; Geradts et al., 2000; Miyakis et al., 2003)。

Chromosome 9：

肺癌組織在第 9 對染色體產生 LOH 的區域為 9p21-22，頻率可達 70%，在此區域有一個抑癌基因 CDKN2，CDKN2 基因及其蛋白 p16 之變異也在 60% 的肺癌組織發現 (Geradts et al., 2001)；而 p16CDKN2 蛋白不表現之主要原因為其促進子過度甲基化所造成 (Gazzeri et al., 1998；Belinsky et al., 1998)。

Chromosome 13：

肺癌組織在第 13 對染色體之 LOH 情形高達 73%，其中位於 13q13-14 之 RB 基因已被證實與 15-30% NSCLC 形成有關 (Geradts et al., 1999)。

Chromosome 17：

肺癌組織在第 17 對染色體有接近 70% 產生 LOH，主要發生位置在 17p13.1，此區域包含 p53 抑癌基因，p53 抑癌基因亦有高頻率產生基因突變或蛋白過度表現的情形 (Sundaresan et al., 1992；Harris et al., 1996)。

Chromosome 18：

肺癌組織在第 18 對染色體產生 LOH 的機率約為 40%，其最主要的區域為 18q21，此區域包含二個抑癌基因：SMAD2 及 SMAD4，這二個基因參與 TGF- β 1 訊息傳遞系統 (Duff and Clarke, 1998)，其變異只在少數肺癌組織發生 (Norgaard et al., 1996；Takenoshita et al., 1997)。而在其他染色體在肺癌組織產生 LOH 之機率，在 5q21-22 約 40%，6q23-24, 6q26-27 約 50%，8p21-22 約 65%，11q23 約 33% (Virmani et al. 1998)。

8. 環境暴露與染色體不穩定的相關性

過去有許多在肺癌的研究中都發現有染色體不穩定的現象 (Haruki et al., 2001；Balsara and Testa et al., 2002；Tseng et al., 2005)，有研究指出抽菸者其 FHIT 及 FRA3B 位置有較高頻率的 LOH 而導致癌症的發生 (Sozzi G et al., 1997；Stein et al., 2002)，FHIT 的異質性基因座缺失與 p53 基因上的突變有相關性，而 p53 基因的突變是由於香菸中 benzo[a]pyrene 形成鍵結物所造成的 (Denissenko et al., 1996)。由以上結果，推測香煙會促

進 FHIT 基因的異質性基因座缺失。另有研究指出長期暴露重鉻酸鹽的工作者其 mismatch repair 路徑中的 hMLH1 及 hMLH2 基因表現會明顯被抑制進而導致染色體的不穩定 (Takahashi et al., 2005)。亦有研究指出長期暴露環境污染物會增加其 micronucleus 發生的頻率 (Iarmarcovai et al., 2007)，micronucleus 被認為是發生染色體不穩定的一項生物指標，因此根據上述結果暴露環境污染物確實會造成基因體發生不穩定的頻率增加。而本研究室過去研究分析二手菸、廚房油煙、汽機車排放物中常見的 B(a)p 代謝產物攻擊 DNA 所產生的 BPDE-like DNA 鍵結物含量，結果發現肺癌患者肺腫瘤組織中的 BPDE-like DNA 鍵結物含量高於非癌症患者 (Cheng et al., 2000)，但在不抽菸女性肺癌患者肺腫瘤組織中的鍵結物含量與抽菸患者並無統計上的差異 (Cheng et al., 2001)，此結果顯示女性不抽煙肺癌患者暴露環境污染物後所產生的 DNA 傷害並不低於抽菸者。因此認為不抽菸女性肺癌患者暴露環境污染物亦可能經由造成其染色體的不穩定而導致肺癌的發生。

9. 病毒感染與染色體不穩定的相關性

許多體外實驗顯示人類乳突瘤病毒嵌入宿主的基因後，會促使 HPV E6、E7 的表現，進而誘使細胞的變態轉型作用 (Durst et al., 1991)。此外嵌入狀態之 HPV 具有持續性，游離狀態的 HPV 病毒則會隨著培養細胞子代代數的增加而逐漸減少 (Joen et al., 1995)。在體內實驗的結果亦指出 HPV 嵌入的狀態會隨病程的惡化而逐漸增加 (Das et al., 1992)。如果是良性壞死，HPV 是以 episomal DNA 形式存在，當發展至入侵性癌症時，則嵌入宿主 DNA 中 (Widebrauk et al., 1993)。不論是 HPV16 或是 HPV18 均有嵌入的狀況 (Cullen et al., 1991)。就嵌入位置而言，有些研究指出，HPV 容易在染色體的側翼 (fragile site)、致癌基因 (oncogene)、以及染色體斷裂處 (cancer chromosome breakpoints) 附近發生嵌入 (Cannizzaro et al., 1988)。最近的研究也指出 HPV DNA 的嵌入會造成宿主細胞基因的不穩定 (Dufensing et al., 2007)。而本研究室最近的在 RS-PCR 方法分析結果發現 HPV 感染肺細胞後會嵌入宿主染色體，其嵌入宿主染色體的位置分別在 Chromosome 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 18 及 X chromosome。嵌入頻率較高者有 Chromosome 1, 2, 5, 6, 14 及 X chromosome，且嵌入之位置大多在 EcoRI 序列，佔 57.1% 以上，以上初步結果

顯示 HPV 嵌入宿主 DNA 之位置似乎有些特異性，與過去在 cervical cancer 之研究結果有些不同。而在部分 HPV 有感染及未感染之肺癌患者之 genome-wide LOH 分析。初步結果顯示 HPV 感染之肺腫瘤中在 18p11.2、18q12.1、19p13.2、21q22.11、22q12.3 及 Xp11.4 這些位置比沒有 HPV 感染者有較高發生 LOH 之頻率，這些初步結果未來將與 genome-wide LOH 之完整研究結果做比較，以釐清 HPV 感染參與台灣女肺腺癌形成之主要致腫瘤路徑。

此外，HPV 嵌入宿主染色體後會使其致癌蛋白 E6 或 E7 表現，當 HPV 16E6 或 E7 致癌蛋白表現時會抑制細胞週期調控因子如：p53, p21, Rb 及 p27 等基因的表現進而使其無法抑制其下游基因的表現，當其下游基因如 cyclin E/CDK2, Cyclin D/CDK2 或 cdc25 等活化後細胞便會不斷增生，而此時則容易造成 centrosome 的改變或有絲分裂發生錯誤而導致染色體不穩定(White et al., 1994; Hasida et al., 1991; Stefan et al., 2002; Gatzka et al., 2005; Dufensing et al., 2007)。而本研究室的結果也發現 HPV 感染的肺癌患者肺腫瘤組織中約有四分之一可測得 HPV 16/18 E6 致癌蛋白的表現，且 HPV 16/18 E6 致癌蛋白與抑癌蛋白 p53 的表現呈負相關，且在 HPV 16/18 E6 表現 p53 蛋白不表現者其下游基因 p21 及 mdm2 mRNA 的表現量也相對較低，而此結果也在本研究室建立的具有 HPV 感染的肺癌細胞株中得到驗證(Cheng et al., 2007)。因此推測 HPV 感染肺組織後可能經由嵌入宿主染色體或表現其 E6 致癌蛋白而使染色體發生不穩定而參與肺癌的形成。

10. 病毒感染與基因體甲基化的相關性

近年來有許多研究指出致癌病毒除產生致癌蛋白外，亦發現可能會藉由造成宿主細胞抑癌基因起動區的過度甲基化而使宿主細胞之抑癌基因無法進行轉錄作用進而使抑癌蛋白無法產生而導致宿主細胞癌化，如：在 HBV 或 HCV 感染之肝癌患者之腫瘤組織中 p16、RASFF1A 及 Estrogen receptor 基因甲基化發生的頻率遠高於 HBV 或 HCV 未感染之肝癌患者 (Shen et al., 2002; Schagdarsurengin et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhong et al., 2003)；在 EBV 感染之胃腫瘤組織中 p14、p15、p16、TIMP3、E-cadherin 及 DAPK 等抑癌基因發生甲基化的頻率均遠高於 EBV 未感染之胃腫瘤組織 (Chong et al., 2003)；

將 SV40T 抗原轉染到人類正常肺上皮細胞(NHBE cell) 中也發現 SV40 可藉由增加甲基轉移酶DNMT3b 的表現而使 FHIT TSLC1 RASSF1A 等抑癌基因甲基化進而抑制其表現而促使細胞的癌化 (Soejina et al., 2003)。在子宮頸鱗狀上皮細胞癌的研究中也發現腫瘤組織中之抑癌基因 RASSF1A 基因的甲基化與 HPV 感染有關 (Cohen et al., 2003)。而本研究室最近的研究結果亦發現在 HPV 感染的肺癌患者之肺腫瘤組織中 p16 及 RASSF1A 抑癌基因甲基化的發生頻率遠高於沒有 HPV 感染之肺癌患者 (Wu et al., 2005)，因此推測 HPV 感染亦可能經由使 BRCA1、BRCA2、XRCC1 及 XRCC5 等基因發生甲基化而抑制其活性，進而造成基因體的不穩定。

有研究指出僅有高危險型 HPV 的感染，並無法誘發人類腫瘤形成，必須同時有致癌物暴露，當無法及時修復時，會堆積大量之 DNA 鍵結物，而引起抑癌或致癌基因發生突變，導致肺癌形成。因此大膽推測台灣不抽菸女性肺癌患者，有高含量之 DNA 鍵結物堆積，又有高頻率之 HPV16/18 感染，可能會經由促進染色體不穩定 (chromosomal instability, CIN) 發生之頻率增加導致肺癌形成。因此提出本三年研究計畫，期望能釐清環境污染物暴露以及 HPV 感染的交互影響，是否會促進染色體不穩定之發生，而造成不抽菸者發生肺癌？

本計畫的研究成果將有助於瞭解環境污染物暴露和 HPV 感染之交互作用，是否會經由增加染色體不穩定頻率而參與不抽菸者肺癌的形成，尤其是台灣不抽菸婦女的肺癌形成。當然最重要的是能找到參與不抽菸者肺癌形成之可能致腫瘤基因和路徑，以做為未來預防與臨床治療的重要參考。

二、方法

1. HPV 感染及未感染肺腺癌細胞株之培養:

由肺癌患者胸水中所建立的 HPV 感染及未感染肺腺癌細胞株是以含 10%FBS 的 RPMI1640 培養基於 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中進行培養，每隔 5 代及針對其 HPV 感染情形及 karyotype 進行分析，直至目前為止共培養 162 代，其 HPV 感染情形及 karyotype 與細胞株剛建立時的狀態並無發生改變，因此本研究將以這些 HPV 感染及未感染肺腺癌細胞株進行研究。

2. HPV 16 E6 基因剔除細胞株之建立方式如下:

將兩條互補之 HPV16/18 E6/E7 干擾引子接合至 pcDNA3.1 / Myc-HisA(-) / HU6 的質體上，轉植入 Competent Bacterial Cells 中培養後抽取載體 DNA 後以 DOTAP 轉染至 HPV 16 positive 的 TL-1, TL-2 及 TL3 3 株 HPV 16E6 表現量不同的肺腺癌細胞株中，並轉染至子宮頸癌細胞株 SiHa 及 HeLa 細胞當成正控制組，加入含有 G418 的培養基以挑選穩定表現上述基因的細胞。

3. HPV 16E6 基因轉染細胞株之建立:

利用 PCR 反應合成 HPV16 E6 之全長基因，將此片段純化後與載體進行 ligation。將 ligation 後的產物送入 JM109 competent cells，培養後萃取載體 DNA 以 DNA 定序儀確認接入基因之方向性及序列之正確性。將上述載體以 DOTAP 轉染至 HPV 未感染的 TL-4-TL15 肺腺癌細胞株，並轉染至沒有 HPV 感染之子宮頸癌細胞株 C33A 中及肺癌細胞株 A549 細胞作為控制組，加入含有 G418 的培養基以挑選穩定表現上述基因的細胞。

4. Micronuclei 分析: 以 Fluorescent in situ hybridization 方法進行

micronuclei 被認為可用來當作發生基因體不穩定的生物指標，進行步驟如下:以螢光標的的 centrosome-negative 及 centrosome-positive probe 與細胞進行雜交並以螢光顯微鏡觀察結果，結果以統計 1000 個 binucleated cell 的結果作統計。

5. 以 MSP-PCR 進行 hMLH1、hMLH2、XRCC1、XRCC3、XRCC5、BRCA1 及 BRCA2 基因轉錄起始區甲基化分析

將細胞以傳統 phenol / chloroform 方式萃取 DNA，以便進行 MS-PCR 及 DNA 定序。本研究利用 Methylation-Specific PCR (MSP) 的方法來檢測各基因啟動區的甲基化情形。MSP 的實驗原理是運用 Sodium bisulfite 化學修飾(chemical modification)的能力，將 DNA 上的 cytosine 轉變成 uracil。假如 cytosine 原本即具有甲基化(5-methylcytosine)的狀態時，Sodium bisulfite 則無法將其轉變成 uracil 而依然保持 cytosine 的型式，之後再使用 primer 將甲基化的 DNA 序列擴大 (amplification)，進一步確認其為甲基化 (methylated) DNA。此外並設計另一組 primer，針對原本即無甲基化而由 cytosine 轉變成 uracil 的 DNA，進行 DNA 序列擴大，而得知其為未甲基化 (unmethylated) 的 DNA (Herman et al., 1996)。Bisulfite modification：取 6 μg (濃度 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) tumor DNA 加入 4 μg calf thymus DNA (Carrier DNA)、15 μl 二次水及 25 μl 0.4N NaOH (最終濃度 0.2 N) 混和均勻後，置於熱循環機反應 37°C 10 分鐘。取出，加入 30 μl 10mM Hydroquinone 與 520 μl 3M pH 5.0 的 sodium bisulfite 混和均勻，置於乾浴加熱器(dry bath) 50°C 16 個小時。接著用 Wizard DNA Clean-Up System 純化 DNA，並以此 DNA 進行 PCR 反應，PCR 產物經 2% agarose gel 電泳後，再以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘，再用紫外光數位顯像儀拍照電泳的結果。再確定產物後，以 GENECLEAN III KIT (BIO 101, USA) 將產物純化出來，並採 DyeDeoxy Terminator 方法，以 ABI 3100 自動定序儀分析。

6. 以 real-time RT-PCR 偵測 hMLH1、hMLH2、XRCC1、XRCC3、XRCC5、BRCA1 及 BRCA2 基因表現

real-time RT-PCR 步驟如下：將細胞收下後，加入 1 ml TRIzol 於室溫反應水解細胞，待細胞完全水解後加入氯仿 (chloroform) 混合均勻後離心，取上清液加入於室溫反應 15 分鐘後，將 RNA 沉澱出來，再以 75%酒精去除殘留的鹽類與 isopropanol，經離心留下 RNA 沉澱物，將 RNA 溶於 DEPC H₂O。取 5 μg RNA 以 oligo dT 為 primer，於 72°C 反應 10 分鐘，使 oligo dT 接合到 RNA 模板上，再加入 4 μl 反轉錄酵素反應

buffer、1 μ l 0.1M DTT 及 1 μ l 10 mM dNTP 在 42°C 作用 2 分鐘後，再加入 1 μ l 反轉錄酵素 (Reverse transcriptase)，在 42°C 作用 1 小時，合成 cDNA 用做 PCR 分析用。RNA 經反轉錄作用後，利用 SYBRN GREEN Kit 進行 PCR，藉以量化標的基因表現情形。

7. 以西方墨點法偵測 hMLH1、hMLH2、XRCC1、XRCC3、XRCC5、BRCA1 及 BRCA2 蛋白表現

將細胞以 protein lysis buffer 水解後，定量蛋白濃度。取 20 μ g 蛋白以 12.5% polyacrylamide gel 進行蛋白電泳，電泳完成後，進行蛋白轉移，將蛋白轉移至 PVDF membrane 上，放入脫脂牛奶中，置於室溫緩慢搖動一小時，將牛奶倒掉加入預測蛋白之一次抗體室溫反應一小時，然後以含 0.1% Tween 20 的 5% 的脫脂牛奶清洗三次，之後加入二次抗體 (anti-mouse 或 anti-rabbit IgG)，室溫反應一小時，重複清洗步驟，最後加入 ECL 反應 2 分鐘，再以 X 光片曝光後，以 Densitometer 分析定量 (Krutovskikh et al., 1994)。

8. 以 tissue array 分析 BPDE-like DNA 鍵結物, HPV16 E6 蛋白, hMLH1、hMLH2、XRCC1、XRCC3、XRCC5、BRCA1 及 BRCA2 在 HPV 感染之肺癌組織中的表現情形: 組織陣列 tissue array 及免疫組織化學染色法 immunohistochemistry

將由台中榮民總醫院胸腔外科，彰化基督教醫院胸腔外科及中山醫學大學附設醫院病理科所取得之肺癌組織先以 nested-PCR 分析是否有 HPV16 的感染，並請病理部提供蠟塊及切片進行 HPV 16E6 蛋白表現分析，並將 HPV 16E6 蛋白及不表現者區分後以組織擷取針將相對位置的蠟塊取下後製備 tissue array 用，過去以傳統方式一片一片染色耗費大量人力，財力與時間，若能製備成 tissue array 將可大大節省不必要的浪費，因此本研究室以成功的建立 tissue array 的包埋技術，將 600 例肺癌檢體依抽菸與否、性別、腫瘤形式及期別等製成 10 塊 tissue assay 蠟快後做去連結處理，以利後續分析用。免疫組織化學染色法步驟如下：將蠟塊切成厚度為 2.5 μ m 的組織切片置於二甲苯 (Xylene) 中，使組織完全脫蠟。再以高至低不同濃度酒精使組織覆水。將組織切片浸泡在 3% H_2O_2 於避免組織中之 peroxidase 干擾最後的呈色結果。接著放入 0.01M citrate buffer (pH=6.0) 中，以微波加熱，再將組織切片浸泡於 1x PBS 緩衝液中。

以欲測蛋白之一次抗體稀釋後在室溫下作用 1 小時。以 1x PBS 緩衝溶液洗 3 次，每次 5 分鐘。加入 biotinylated 二次抗體，於室溫作用 10 分鐘，再以 1x PBS 緩衝溶液洗 3 次後，加入 streptavidin，於室溫作用 10 分鐘，再以 1x PBS 緩衝溶液洗 3 次後，DAB 呈色 10 分鐘。呈色後以 haematoxylin (MERCK) 做背景染色，染色結果之判讀，是經由 3 個以上人士(至少包括一位臨床病理科醫師) 依照 DAB 於組織切片呈色之範圍，來判斷其蛋白表現情形。若是所有腫瘤細胞的核都沒有染到，以 (-) 表示。>1% 的腫瘤細胞有表現以 "+" 表示。

9. 以競爭性 ELISA 分析肺腫瘤組織中的 BPDE-like DNA 鍵結物含量

以競爭性 ELISA 分析肺腫瘤組織中的 BPDE-like DNA 鍵結物含量並與免疫染色之 BPDE-like DNA 鍵結物含量結果做比較，希望能建立一套量化標準，日後將可所短分析時間及檢體的使用量。ELISA 分析及免疫組織化學染色分析所用的 BPDE-Ab 為本研究室與長庚謝玲玲教授合作所建立(Cheng et al., 2001)。步驟如下:先將 BPDE-DNA 以 3 ng/100 μ l PBS 的濃度加到 96 well plate 中在 37°C 反應 8 小時後以 PBS 洗去殘餘的鹽類後放置於 4°C 冰箱保存備用。將已鍵結 BPDE-DNA 之 96 孔 plate，以 300 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l 含 1% FBS 之 PBS 於 37°C 反應 1 小時以去除非特異性之結合反應，以 250 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l 含 $1:5 \times 10^5$ 稀釋之 BPDE-Ab 及待測 DNA 混合之混合液於 37°C 反應 1 小時，以 300 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l $1:1 \times 10^3$ 稀釋之 anti-rabbit IgG-AP 於 37°C 反應 1 小時，以 300 μ l PBS 緩衝液清洗三次，加入 100 μ l PNPP solution 於室溫反應 15 分鐘(10mg/20ml 1M diethanolamine, pH 8.6)，加入 25 μ l 3N NaOH 以終止反應。以 OD 405/630nm 測吸光值，吸光值應介於 0.4-1 之間，每次實驗應以不同濃度之 BPDE-DNA 為標準品做一校正曲線，每次實驗之校正曲線誤差必須小於 $\pm 10\%$ ，待測樣本也以三次獨立實驗求得平均值及標準差。

10. 染色體不穩定分析: 以 Genome-wide 分析

將檢體依 adduct high/HPV E6+、adduct high/HPV E6-、adduct low/HPV E6+ 及 adduct low/HPV E6- 4 組，並利用雷射細胞擷取儀分別擷取腫瘤及非腫瘤部位的檢體，以 396 個 genome-wide marker 全面篩檢方式找出發生基因體不穩定的位置，並將 4 組結果做

比較。步驟如下：將細胞挑至含有 50 μ l lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, pH 8.0)的 microtube 中，再加入 1mg/ml 的 proteinase K 5 μ l，置於 56°C 作用 18~24 個小時，直至組織完全水解為止。以等體積的 phenol/choloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)萃取後，以 100%冰酒精將 DNA 沉澱出來，將沉澱出來的 DNA 溶於 10 μ l 的滅菌水中用於 genome-wide LOH 分析 (Thorland et al., 2000)。Genome-wide LOH 基因型檢測是利用以藍 (FAM)、綠 (VIC)、黃 (NED) 三種螢光標定的引子(primer) 進行聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。引子組包括 400 個微衛星標記 (microsatellite marker)，購自 Applied Biosystems 公司，進行全基因體(genome-wide)的檢測。400 個微衛星標記平均分佈於人類 22 對染色體及 X 染色體中，其平均分佈間距 9.2cM(centimorgan)，異合性頻率平均值約 0.79。實驗將以鄰近正常肺組織的 DNA 利用聚合酵素連鎖反應(PCR) 所得的產物經軟體分析後，若含有兩種不同長度的片段，則表示此個案在此標記(marker)位置是異型合子 (heterozygote)，也就是情報個案(informative case)。反之，若只有一種長度的產物則屬於同型合子(homozygote)，也就是非情報個案(non-informative case)。個案判斷為異型合子者，以其鄰近正常肺組織 DNA PCR 產物為基準，依下列公式計算：

$$\frac{\frac{\text{Height of normal allele two}}{\text{Height of normal allele one}}}{\frac{\text{Height of tumor allele two}}{\text{Height of tumor allele one}}}$$

算出結果若小於或等於 0.49 或是大於或等於 2.04，即判斷腫瘤檢體 DNA 異合性基因座缺失。

11. 細胞週期分析

以 siRNA 或基因轉染改變標的基因在細胞中的表現後處理後收取細胞，以 70% EtOH 於 4°C 反應 18 小時，以 PBS 清洗後離心，RNase 處理後以 PI 染色，並以流式細胞儀分析細胞週期。

12. 致腫瘤能力的改變:以soft agar assay方式分析

將 siRNA 或基因轉染改變標的基因的細胞 5000 個種於含有 1% base agar 及 0.35% top agar 的培養基中培養 14-21 天，並以顯微鏡觀持查並測量其 colony 大小及數量。

三、 結果與討論

本研究主要希望釐清暴露環境污染物及 HPV 感染交互影響，是否會促進CIN之發生？因此利用本研究室自行由肺癌患者之胸水，建立培養出來的具有HPV16 E6及沒有 HPV 感染的肺腺癌細胞株進行研究 (Cheng et al., 2007)。如Figure 1所示，在建立之有HPV16 E6感染的肺腺癌細胞株中確實可測得HPV 16E6及E7致癌蛋白的表現，其所調控之p53及Rb蛋白的表現亦受到抑制，且p53下游基因p21及mdm2的表現亦受到抑制，而在此細胞 (TL-1, TL-2及TL-3)抑制HPV16 E6則可回復p53及其下游基因p21及mdm2的表現，而在 HPV未感染之肺癌細胞株(TL-4至TL-15) 則測不到HPV 16E6及E7致癌蛋白的表現，因此本研究分別以TL-1至TL-15進行後續實驗。

為進一步了解以低劑量B[a]P長期處理後，HPV感染及未感染之肺癌細胞株之micronuclei的發生頻率是否不同，因此本研究進一步以 $0.01 \mu\text{M}$ B[a]P分別處理TL-1至TL-15肺癌細胞株並以 FISH方法偵測 micronuclei，結果如Figure 2及Figure 3所示。結果發現以低劑量 B[a]P處理14天後，HPV感染之TL-1, TL-2及TL-3細胞之micronuclei的發生頻率顯著高於 HPV未感染之肺癌細胞株(TL-4至TL-15)。為進一步證明肺癌細胞對B[a]P的化學感受性與 HPV有關，本嚴就分別在HPV感染的TL-1, TL-2及TL-3細胞中以siRNA抑制其HPV16致癌基因的表現，結果發現當HPV16致癌基因的表現被抑制，其經低劑量B[a]P長期處理後產生micronuclei的發生率亦顯著降低 (Figure 4)。反之，若在HPV未感染之肺癌細胞株(TL-4至TL-15)中轉染HPV 16致癌基因，其經低劑量B[a]P長期處理後產生micronuclei的發生率亦顯著增加 (Figure 5)，因此推測HPV感染之肺癌細胞株在低劑量B[a]P長期處理後較易產生染色體不穩定 (chromosomal instability, CIN)。許多體外實驗顯示人類乳突瘤病毒嵌入宿主的基因後，會促使HPV E6、E7 的表現，進而誘使細胞的變態轉型作用 (Durst et al., 1991)。此外嵌入狀態之HPV具有持續性，游離狀態的HPV病毒則會隨著培養細胞子代代數的增加而逐漸減少 (Joen et al., 1995)。在體內實驗的結果亦指出HPV嵌入的狀態會隨病程的惡化而逐漸增加 (Das et al., 1992)。如果是良性壞死，HPV是以episomal DNA 形式存在，當發展至入侵性癌症時，則嵌入宿主DNA 中(Widebrauk et al., 1993)。不論是

HPV16 或是HPV18 均有嵌入的狀況(Cullen et al., 1991)。就嵌入位置而言，有些研究指出，HPV容易在染色體的側翼(fragile site)、致癌基因(oncogene)、以及染色體斷裂處(cancer chromosome breakpoints) 附近發生嵌入(Cannizzaro et al., 1988)。最近的研究也指出HPV DNA 的嵌入亦造成宿主細胞基因的不穩定(Dufensing et al., 2007)。

為進一步了解染色體不穩定 (chromosomal instability, CIN) 是否是經由抑制 hMLH1、hMLH2、XRCC1、XRCC3、XRCC5、BRCA1和 BRCA2 等基因的表現所致，本研究進一步以 real-time RT-PCR 和 Western blotting分析這些DNA修補基因的 mRNA 及其蛋白之表現，如Figure 6所示，經低劑量B[a]P處理7天、14天及21天後，僅XRCC3及XRCC5在HPV感染及未感染HPV之肺癌細胞株間的表現有差異，在HPV感染之肺癌細胞株中，其XRCC3及XRCC5的基因及蛋白表現隨處理天數增加而減少，而在HPV未感染之TL-4細胞則無此現象。因此HPV感染之肺癌細胞株對於低劑量B[a]P長期處理有較高頻率的CIN可能與其XRCC3及XRCC5的基因及蛋白表現受到抑制有關。為進一步了解XRCC3及XRCC5蛋白在肺腫瘤組織的表現情形，本研究進一步利用本研究室已建立好的肺癌組織陣列切片進行免疫組織化學染色(Immunohistochemistry) 分析 B[a]P-DNA 鍵結物含量、HPV16 E6、XRCC3及XRCC5基因之蛋白表現的相關性。由以上之所得結果將肺癌患者分為 adduct high/HPV E6+、adduct high/HPV E6-、adduct low/HPV E6+及adduct low/HPV E6- 等四組，並與XRCC3及XRCC5修補基因的表現做一比較，結果發現XRCC3蛋白在adduct high/HPV E6+組的表現率顯著低於adduct high/HPV E6-、adduct low/HPV E6+及adduct low/HPV E6- 三組 ($p < 0.0001$; Table 1)，而在adduct low/HPV E6+組的XRCC3蛋白表現又低於adduct high/HPV E6-及adduct low/HPV E6- 兩組，由此顯示HPV對於XRCC3蛋白表現的影響顯著高於DNA adducts。而在XRCC5與B[a]P-DNA 鍵結物含量及HPV16 E6的相關性分析結果與XRCC3結果相似($p = 0.001$; Table 2)。因此HPV感染之肺癌細胞株對於低劑量B[a]P長期處理有較高頻率的CIN與其XRCC3及XRCC5的基因及蛋白表現受到抑制所致。Chen 等人 (2009)研究發現HPV16E6可藉由抑制p53蛋白或藉由與其他蛋白結合而抑制其下游調控之DNA修補基因CHK1的表現而使細胞無法移除

BPDE DNA鍵結物 (Chen et al., 2009)。Kadaja等人(2009)的研究也發現高危險型HPV可藉由抑制DNA修補基因的表現而使細胞受到致癌物暴露時增加其染色體的不穩定而導致細胞癌化 (Kadaja et al., 2009)。而本研究室過去的研究亦發現HPV感染者約有四分之一可測得HPV 16/18 E6致癌蛋白的表現，且HPV 16/18 E6致癌蛋白與抑癌蛋白p53的表現呈負相關 (Cheng et al., 2007)。因此，HPV感染之肺癌細胞株其XRCC3及XRCC5的基因及蛋白表現受到抑制可能與p53表現受抑制有關

本計畫進一步以Genomic-wide全面篩檢 adduct high/HPV E6+、adduct high/HPV E6-、adduct low/HPV E6+及adduct low/HPV E6- 等四組肺癌患者之基因體發生異質性缺失 (loss of heterozygosity, LOH)的位置，並希望能經由發生LOH位置，找到並確定主要參與之已知與未知之TSGs。首先利用400個微衛星標記 (microsatellite marker) 對adduct high/HPV E6+、adduct high/HPV E6-、adduct low/HPV E6+及adduct low/HPV E6- 等四組等四組各10位肺腺癌患者之腫瘤組織進行LOH分析，本研究利用雷射細胞擷取儀取得腫瘤細胞萃取其DNA並以患者之週邊淋巴球DNA為控制組，進行基因不穩定分析。在分析完400個微衛星標記後其中有4個位置與本研究過去利用RS-PCR分析HPV嵌入宿主染色體所得之分析結果一致，包括 6q27, 8q24.22, 18p11.2, 及Xp11.4。過去在子宮頸癌的研究指出，HPV容易在染色體的側翼(fragile site)、致癌基因(oncogene)、以及染色體斷裂處 (cancer chromosome breakpoints) 附近發生嵌入(Cannizzro et al., 1988) 進而引起抑癌基因不活化或是致癌基因的過度活化。在抽菸的肺癌及HPV相關的子宮頸癌研究中均發現FHIT 基因的異質性缺失(LOH)。因此推測抑癌基因FHIT的LOH可能參與了與抽菸有關的肺腫瘤及與HPV感染有關的子宮頸癌形成。而本研究室過去的研究亦發現在HPV16感染的女性肺癌患者相較於未感染者有較高的FHIT LOH (46% v.s 18%) (Wang et al., 2005)，因此推測不抽菸女性肺癌患者感染HPV可能透過促使FHIT基因發生異質性缺失而參與肺腫瘤的形成。

本研究進一步利用上述找到的位置，包括在子宮頸癌的研究中發現與HPV感染有關的myc基因及hTERT基因做進一步分析，共分析135為肺癌患者之肺腫瘤組織中的hTERT

mRNA表現與HPV感染之相關性，結果如Table 3 所示，hTERT mRNA在HPV16感染及HPV16或18感染者其hTERT mRNA表現量顯著高於為感染者，但單獨只有HPV18感染者則無此現象 (HPV 16, $p < 0.0001$; HPV 18, $P = 0.1$; HPV16 or 18, $P = 0.001$)。進一步以HPV感染及未感染之肺癌細胞株分析其機轉，在western blot及CHIP的分析結果得知HPV可能藉由增加c-myc蛋白的表現進而使其結合到hTERT基因promter的能力增加而正調控hTERT基因的表現(Figure 7)。過去的研究顯示p53基因會抑制c-myc基因的轉錄調控而使細胞週期停止在G1期(Xu et al., 2000)，本研究室過去研究發現肺腫瘤組織中可測得HPV 16/18 E6致癌蛋白的表現，且HPV 16/18 E6致癌蛋白與抑癌蛋白p53的表現呈負相關 (Cheng et al., 2007)。而在本研究結果亦發現環境污染物與HPV的交互作用會造成基因體不穩定而活化c-myc的表現進而促使其活化hTERT而造成肺細胞的腫瘤化，因此，c-myc基因在HPV造成的肺腫瘤化過程可能扮演重要角色。

本計畫的研究成果發現環境污染物暴露和HPV感染之交互作用，會經由抑制XRCC3及XRCC5修補基因的表現而增加染色體不穩定頻率，並進而導致hTERT及c-myc基因的活化而參與不抽菸者肺癌的形成，尤其是台灣不抽菸婦女的肺癌形成。

參考文獻:

Balsara BR, Testa JR. Chromosomal imbalance in human lung cancer. *Oncogene* 21:

6877-6883, 2002.

Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, Grimes MJ,

Harms HJ, Tellez CS, Smith TM, Moots PP, Lechner JF, Stidley CA, Crowell RE.

Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 62:2370-2377, 2002.

Bohlmeier T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, and Shroyer KR. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction.

Am. J. Respir. Cell & Mol. Bio., 18(2): 265-9, 1998.

Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Capron

F, Schmitz A, Olschwang S, Thomas G. Concerted nonsyntenic allelic losses in

hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype.

Cancer Res 57:1986-1990, 1997.

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

chromosome breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet*, 33: 93-98, 1988.

Cavalieri EL, and Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacol.*

Ther., 55(2): 183-99, 1992.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL,

Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784, 1983.

Chen B, Simpson DA, Zhou Y, Mitra A, Mitchell DL, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK.

Human papilloma virus type 16 E6 deregulates CHK1 and sensitizes human fibroblasts to environmental carcinogens independently of its effect on p53. *Cell Cycle*, 18: 1775-87, 2009.

Cheng YW, Chen CY, Lin P, Chen CP, Huang KK, Lin TS, Wu MH, and Lee H. DNA adduct

- level in lung tissue may be act as a risk biomarker of lung cancer. *Eur Cancer*, 36, 1381-1388, 2000.
- Cheng YW, Hsieh LL, Lin P, Chen CP, Chen CY, Lin TS, Su JM, and Lee H. Gender difference in DNA adduct levels among non-smoking lung cancer patients. *Environ Mol Mutagen*, 37, 304-310, 2001.
- Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, and Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among non-smoking Taiwanese women. *Cancer Res.*, 61, 2799-2803, 2001.
- Cheng YW, Wu MF, Wang J, Yeh KT, Goan YG, Chiou HL, Chen CY, and Lee H. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res.* 67(22):10686-93, 2007.
- Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor gene in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*, 2: 317-28, 1998.
- Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, and Fukayama M. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci.*, 94: 76-80, 2003.
- Cliby W, Ritland S, Hartmann L, Dodson M, Halling KC, Keeney G, Podratz KC, Jenkins RB. Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Res* 53:2393-2398, 1993.
- Cohen Y, Singer G, Lavie O, Dong SM, Beller U, Sidransky D. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.*, 9(8): 2981-4, 2003.
- Da J, Chen L, and Hu Y. Human papillomavirus infection and p53 gene mutation in primary lung cancer. *Chung-Hau Chung Liu Tsa Chih*, 18(1), 27-29, 1996.

- Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical. *J Gen Virol*, 73: 2327-2336, 1992.
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*, 7: 273-82, 2001.
- Deng J. The prevalence of the cigarette smoking habit among 110,000 adult residents in the Shanghai urban area. *Chung-Hua Yu Fang i Hsueh Tsa Chih* 19(5):271-4, 1985.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 274:430-432, 1996.
- Devesa SS, Blot WJ, and Fraumeni JF. Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. *J. Nat. Cancer Inst.*, 81(20):1568-71, 1989.
- Difilippantonio J, Zhu J, Chen HT, et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature*, 404 : 510-4, 2000.
- Dipple A, Pigott MA, Agarwal SK, Yagi H, Sayer JM, and Jerina DM. Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature*, 327(6122): 535-6, 1987.
- Duensing S and Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoprotein independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*, 62: 7075-7082, 2002.
- Duensing S and Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoprotein. *Int J Cancer*, 109: 157-162, 2004.
- Duensing S and Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoprotein independently induce numerical and structure chromosome instability. *Cancer Res*, 62: 7075-82, 2002.

- Gatza M, Chandhasia C, Ducu RI, Marriate S. Impact of transforming virus on cellular mutagenesis, genome stability, and Cellular transformation. *Environ Mol Mut*, 45: 304-325, 2005.
- Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 16:497-504, 1998.
- Geradts J, Wilentz RE, Roberts H. Immunohistochemical [corrected] detection of the alternate INK4a-encoded tumor suppressor protein p14(ARF) in archival human cancers and cell lines using commercial antibodies: correlation with p16(INK4a) expression. *Mod Pathol* 14:1162-1168, 2001.
- van Gent DC, Hoeijmaker JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA-double strand break connection. *Nat Rev Genet*, 2: 196-206, 2001.
- Girard L, Zochbauer-Muller S, Virmani AK, Gazdar AF, Minna JD. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res* 60: 4894-906, 2002.
- Hashida T, Yasumoto S. Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocyte by human papillomavirus type 16 E7 oncogenes. *J Gen Virol*, 72: 1569-77, 1991.
- Haruki N, Harano T, Masuda A, Kiyono T, Takahashi T, Shimizu S, Mitsudomi T, Konishi H, Osada H, Fujii Y, and Takahashi T. Persistent increase in chromosome instability in lung cancer. *Am. J Pathol.*, 159(4): 1345-1352, 2001.
- Hennig EM, Suo Z, Karlsen F, Holm R, Thoresen S, and Nesland JM. HPV positive bronchopulmonary carcinomas in women with previous high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Acta. Oncologica.*, 38(5):639-47, 1999.
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, and Genka K. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J. Clin. Pathol.*,

49(10):810-7, 1996.

Ho WL, Chang JW, Taeng RC, Chen JT, Chen CY, Jou YS, Wang YC. Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer. *Cancer Detect Prev.*, 26(5):343-9, 2002.

Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, Nyberg F, Pershagen G, Mukeria A, Constantinescu V, Fortes C, and Benhamou S. p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res*, 60(11):2906-11, 2000.

Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, Hewer A, Phillips DH, Ryberg D, Haugen A, and Harris CC. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res*, 61(17):6350-5, 2001.

Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T. Genetic polymorphism and micronucleus formation: A review of literature. *Mut Res.*, accepted, 2007.

Iwamasa T, Miyagi J, Tshako K, Kinjo T, Kamada Y, Hirayasu T, and Genka K. Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Path. Res. Practice*, 196(4):209-18, 2000.

Jeffrey AM, Jennette KW, Blobstein SH, Weinstein IB, Beland FA, Harvey RG, Kasal H, Miura I, and Nakanishi K. Benzo[a]pyrene-nucleic acid derivative found in vivo: structure of a benzo[a]pyrenetetrahydrodiol epoxide-guanosine adduct. *J. Am. Chemical Society*, 98(18):5714-5, 1976.

Jeffrey AM, Weinstein IB, Jennette KW, Grzeskowiak K, Nakanishi K, Harvey RG, Autrup H, and Harris C. Structures of benzo(a)pyrene--nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature*, 269(5626):348-50, 1977.

Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*, 69:

2989-2997, 1995.

Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, Ustav E, Ustay M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog.*, 5: e1000397, 2009.

Khana KK, Jack SP. DNA double-strand break: signaling repair and the cancer connection. *Nat Genet.*, 27: 247-54, 2001.

Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, Hommura F, and Kawakami Y. Altered p16INK4 and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res*, 56(24):5557-62, 1996.

Koo LC, and Cho JH. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int J Epidemiol*, 19: S14-S23, 1990.

Lee MN, Tseng RC, Hsu HS, Chen JY, Tzao C, Ho WL, and Wang YC. Epigenetic inactivation of the chromosome stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13(3): 832-838, 2007.

Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC and Cheng YW. An association of DNMT3b protein expression with p16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Letter*, 226(1):77-84, 2005.

Lobe LA, Emster VL, Warner KE, Abbotts J, and Laszol J. Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*, 44: 5940-5958, 1984.

Miyakis S, Liloglou T, Kearney S, Xinarianos G, Spandidos DA, Field JK. Absence of mutations in the VHL gene but frequent loss of heterozygosity at 3p25-26 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 39:273-277, 2003.

Norgaard P, Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Acquired TGF beta 1 sensitivity and TGF beta 1 expression in cell lines established from a single small cell lung cancer patient during clinical progression. *Lung Cancer*, 14:63-73, 1996.

- Nourva K, Soini Y, Kamel D, Pollanen R, Bloigu R, Vahakanogas K, Paakko P. p53 protein accumulation and the presence of human papillomavirus DNA in bronchiolo-alveolar carcinoma correlate with poor prognosis. *Int. J. cancer*, 64(6), 424-429, 1995.
- Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, and Bos JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.*, 48(20):5738-41, 1988.
- Roggeband R, Wolterbeek AP, Rutten AA, and Baan RA. Comparative 32P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene--DNA adducts formed in vitro upon activation of benzo[a]pyrene by human, rabbit and rodent liver microsomes. *Carcinogenesis*, 14(9):1945-50, 1993.
- Roggeband R, Wolterbeek AP, Melis OW, Wittekoek ME, Rutten AA, Feron VJ, and Baan RA. DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogenesis*, 15(4):661-5, 1994.
- Sato T, Tanigami A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y. Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 50:7184-7189, 1990.
- Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, Schlegelberger B, Dammann R. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 22(12):1866-71, 2003.
- Serraino D, Piselli P, and Scognamiglio P. Viral infections and cancer: epidemiological aspects. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 15 (3):224-228, 2001.
- Shen L, Ahuja N, Shen Y, Habib NA, Toyota M, Rashid A, and Issa, JP. DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*, 94: 755-761, 2002.
- Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, and Rodenhuis S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J.*

- Nat. Cancer Inst., 83(14):1024-7, 1991.
- Soejima K, Fang W, and Rollins BJ. DNA methyltransferase 3b contributes to oncogenic transformation induced by SV40T antigen and activated Ras. *Oncogene*, 22(30): 4723-33, 2003.
- Soini Y. Nuorva K. Kamel D. Pollanen R. Vahakanogas K. Lehto VP. Paakko P. Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma less comments. *Thorax*, 51(9): 878-879, 1996.
- Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS. Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer*, 34(3):333-40, 2002.
- Sundaresan V, Heppell-Parton A, Coleman N, Miozzo M, Sozzi G, Ball R, Cary N, Hasleton P, Fowler W, Rabbitts P. Somatic genetic changes in lung cancer and precancerous lesions. *Ann Oncol*, 27-31; discussion 31-22, 1995.
- Szabo I. Sepp R. Nakamoto K. Maeda M. Sakamoto H. Uda H. Human papillomavirus not found in squamous and large cell lung carcinomas by polymerase chain reaction. *Cancer*, 73 (11):2740-2744,1994.
- Takahashi Y, Kondo K, Hirose T, Nakagawa H, Tsuyuguchi M, Hashimoto M, Sano T, Ochiai A, Monden Y. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Mol Carcinogenesis*, 42: 150-158, 2005.
- Takenoshita S, Hagiwara K, Gemma A, Nagashima M, Ryberg D, Lindstedt BA, Bennett WP, Haugen A, Harris CC. Absence of mutations in the transforming growth factor-beta type II receptor in sporadic lung cancers with microsatellite instability and rare H-ras1 alleles. *Carcinogenesis*, 18:1427-1429, 1997.
- Tay SC, Tsai SF, Lee SS. Lung cancer in Taiwan. *Natl Public Health Assoc (ROC)*, 8(3), 189-201, 1988.
- Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Douagui H, and Kleisbauer JP. Detection of human

- papillomavirus DNA in primary lung carcinoma by nested polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.*, 41(8):1093-7, 1995.
- Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Castelnau O, and Kleisbauer JP. Detection of human papillomavirus by polymerase chain reaction in primary lung carcinoma. *Bulletin du Cancer*, 83(10):842-6, 1996.
- Thomas DB, Ray RM, Kuypers J, Kiviat N, Koetsawang A, Ashley RL, Qin Q, and Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am. J. Epidemiol.*, 153(8):740-8, 2001.
- Tsao YP, Yang KY, Han CP, Yin CS, Yang YF, and Chen SL. Genital human papillomavirus infections in Taiwan. *Int. J. Gynaecol. Obstetrics*, 44(1):39-45, 1994.
- Tseng RC, Chang JW, Hsien FJ, Chang YH, Hsiao CF, Chen JT, Chen CY, Jou YS, Wang YC. Genomewide loss of heterozygosity and its clinical association in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 117: 241-7, 2005.
- Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V, Minna JD, Gazdar AF. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer* 21:308-319, 1998.
- Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, Askin FB, Rodenhuis S, Hruban RH. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 72(2):432-8, 1993.
- White AE, Livanos EM, Tlsty TD. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblast by the HPV oncoprotein. *Genes Dev*, 8: 666-77, 1994.
- Wolterbeek AP, Roggeband R, Steenwinkel MJ, Baan RA, and Rutten AA. Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by ³²P-postlabeling analysis and unscheduled DNA synthesis.

- Carcinogenesis, 14(3):463-7, 1993.
- Wong MP, Lam WK, Wang E, Chiu SW, Lam CL, Chung LP. Primary adenocarcinomas of the lung in nonsmokers show a distinct pattern of allelic imbalance. *Cancer Res* 62: 4464-8, 2002.
- Wong MP, Fung LF, Wang E, Chow WS, Chiu SW, Lam WK, Ho KK, Ma ES, Wan TS, Chung LP. Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer* 97: 1263-70, 2002.
- Wu MF, Cheng YW, Lai JC, Hsu MC, Chen JT, Liu WS, Chiou MC, Chen CY, Lee H. (2004) Frequent p16INK4a promoter hypermethylation in human papillomavirus-infected female lung cancer in Taiwan. *Int J Cancer.*, 113: 440-445.
- Xu D, Wang Q, Gruber A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000;19:5123-33.
- Yang B, Guo M, Herman JG, and Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.*, 163: 1101-1107, 2003.
- Yang SC, Jenq SN, Kang ZC and Lee H. Identification of Benzo[a]pyrene-7,8-diol -9,10-epoxide -N2- deoxyguanosine in human adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000.
- Yousem SA, Ohori NP, Sonmez-Alpan E. Occurance of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasmas. *Cancer*, 69 (3):693-697, 1992.
- Zhong S, Yeo W, Tang MW, Wong N, Lai PS, and Johnson PJ. Intensive hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res.*, 9: 3376-3382, 2003.
- Zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184 (1): 9-13, 1991.

表

Table 1. XRCC3 protein expression in tumor tissues of lung cancer patients with different HPV infection and DNA adducts levels status.

DNA adduct levels/HPV infection	XRCC3 protein expression		p value
	Negative (%)	Positive (%)	
High/+ (n=20)	16 (80.0)	4 (20.0)	
High/- (n=45)	11 (24.4)	34 (75.6)	
Low/+ (n=10)	7 (70.0)	3 (30.0)	
Low/- (n=25)	14 (56.0)	11 (44.0)	<0.0001

Table 2. XRCC5 protein expression in tumor tissues of lung cancer patients with different HPV infection and DNA adducts levels status.

DNA adduct levels/HPV infection	XRCC5 protein expression		p value
	Negative (%)	Positive (%)	
High/+ (n=20)	15 (75.0)	5 (25.0)	
High/- (n=45)	12 (26.6)	33 (73.4)	
Low/+ (n=10)	7 (70.0)	3 (30.0)	
Low/- (n=25)	14 (56.0)	11 (44.0)	0.001

Table 3. Association of HPV 16/18 E6 protein with hTERT mRNA levels in lung tumors.

E6	hTERT mRNA (Ct/10 ⁴)	p value
HPV 16		
Negative (n = 96)	309.86 ± 915.37	
Positive (n = 39)	931.99 ± 1084.50	<0.0001
HPV 18		
Negative (n = 97)	370.21 ± 633.70	
Positive (n = 38)	794.30 ± 1138.27	0.100
HPV 16 or 18		
Negative (n = 72)	227.76 ± 434.52	
Positive (n = 63)	788.81 ± 1042.79	0.001

圖

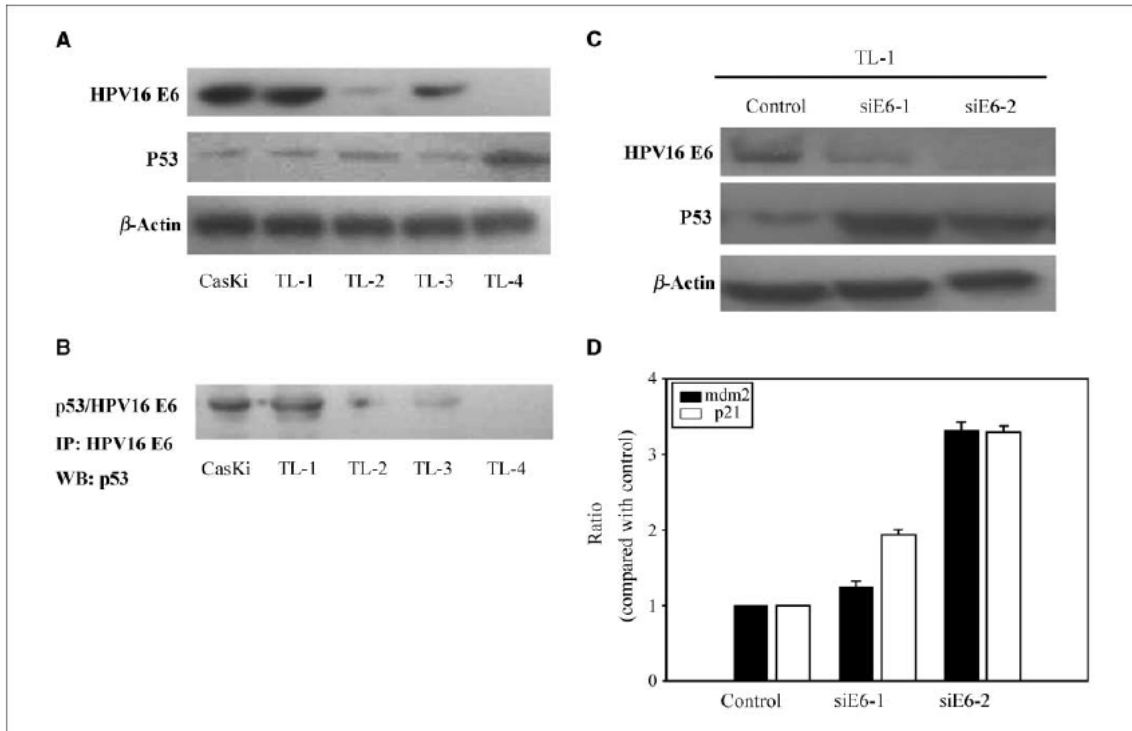


Figure 1. A, detection of HPV16 E6 and p53 protein expression in lung adenocarcinoma cell lines established from pleural effusion. Cervical cancer Caski cells were used as positive control and β -actin was used as internal control. B, correlation between HPV E6 status and p53 protein expression in established lung adenocarcinoma cell lines. The immunoprecipitation results with E6 antibodies followed by immunoblotting of p53 protein were shown in p53/HPV16 E6. Caski cells were used as positive control. C, HPV16 E6 and p53 protein expression in HPV16 E6-knockdown TL-1 cells. SiHa cells were used as positive control and h-actin was used as internal control. D, mdm2 and p21 mRNA expression in HPV16 E6 siRNA-transfected cervical cancer cell line SiHa (data not shown) and lung cancer cell line TL-1 compared with parental control.

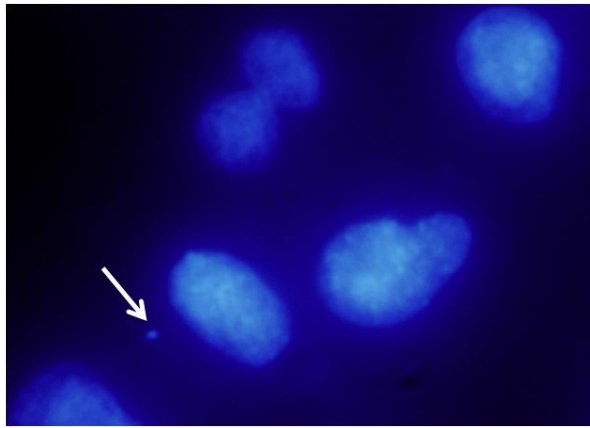


Fig. 2. Micronuclei were detected in HPV-positive lung cancer cells after Bap exposure.

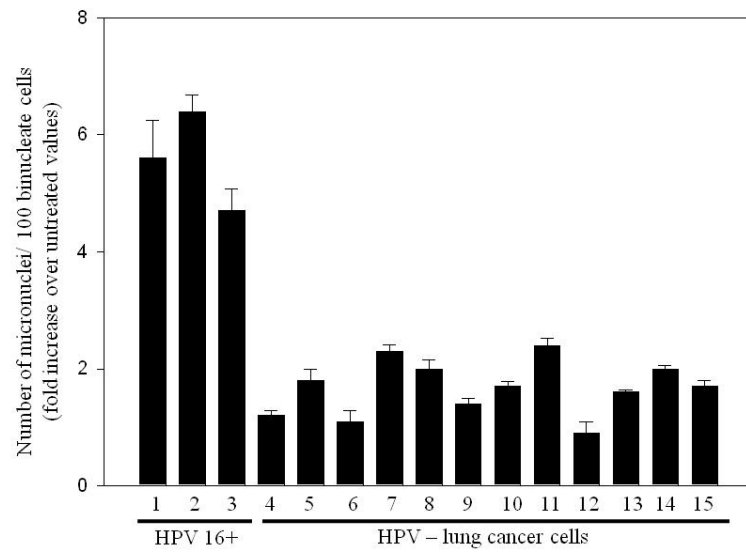


Fig. 3. The micronuclei number induced by B[a]P in HPV-infected lung cancer cells were frequently than in non-infected lung cancer cells. The micronuclei were detected by FISH.

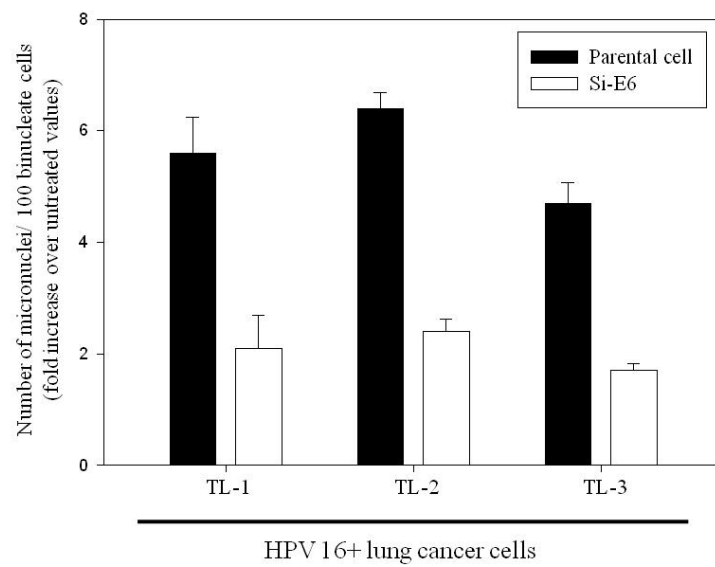


Fig. 4. The numbers of micronuclei were reduced after HPV 16 E6 knockdown. The micronuclei were detected by FISH.

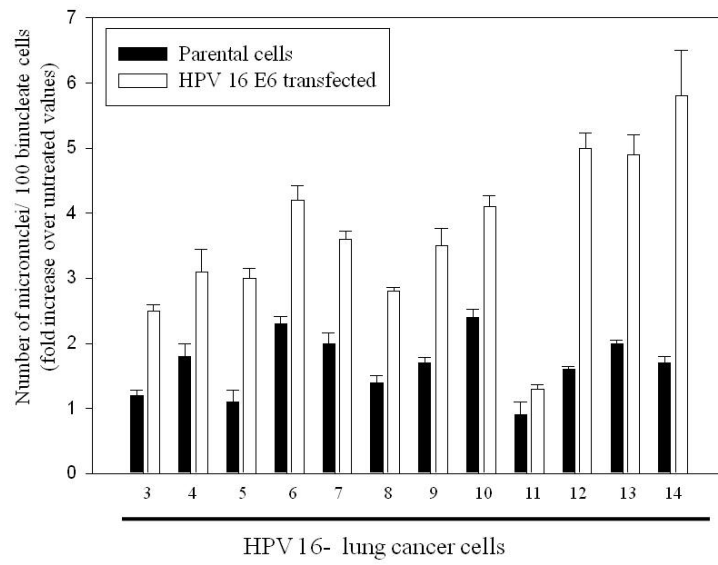


Fig. 5. The numbers of micronuclei were increased after HPV 16 E6 transfected. The micronuclei were detected by FISH.

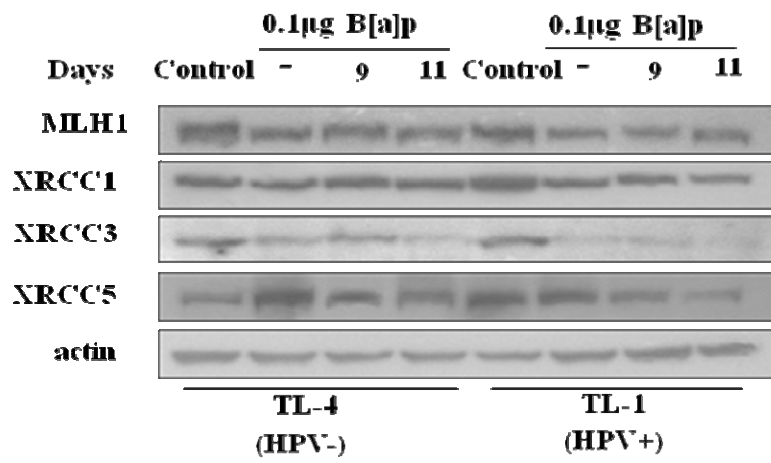


Fig. 6. DNA repair protein expression in HPV+ and HPV- lung cancer cells after treated with low dose B[a]P for 7, 14, and 21 days detected by western blot.

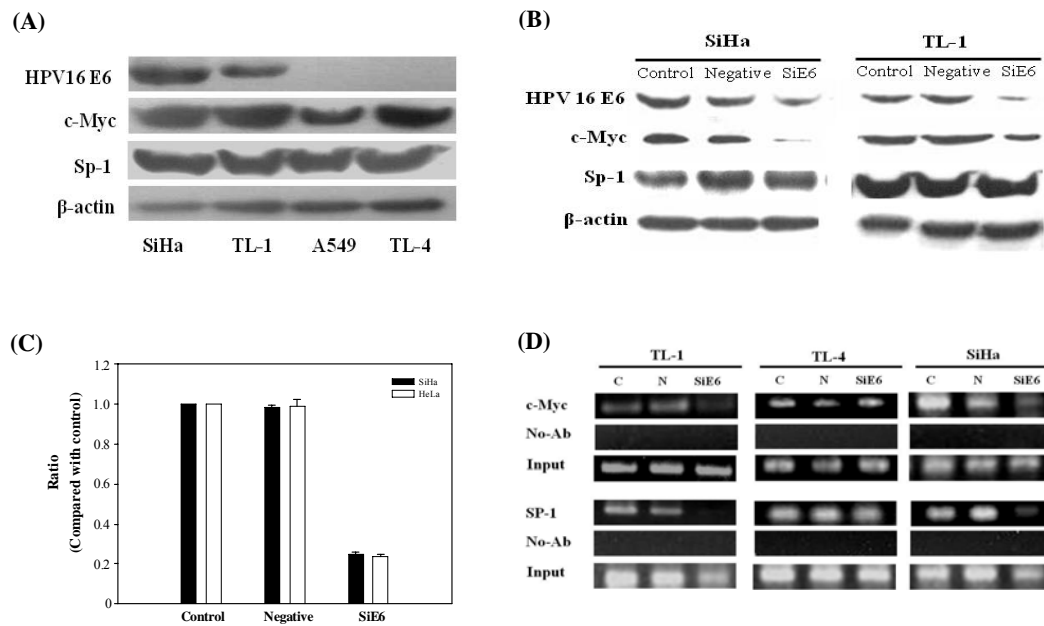


Fig. 7. (A) HPV16 E6, c-Myc, and Sp-1 protein expressions in HPV 16-infected TL-1 lung cancer cells. SiHa cervical cancer cells were used as a positive control, and A549 and TL-4 lung cancer cells were used as HPV non-infected controls. β -actin protein was as a protein loading control. (B) HPV 16 E6 of TL-1 lung cancer cells were knocked down by E6 RNAi. c-Myc, Sp1, and HPV 16 E6 protein in E6 knockdown TL-1 cells were evaluated by western blotting to verify the efficiency of RNAi for E6 as compared with TL-1 parental cells. (C) hTERT mRNA levels in E6 knockdown TL-1 cells evaluated by real-time RT-PCR were compared with that of TL-1 parental cells. (D) Binding activity of c-Myc and Sp-1 to the hTERT promoter evaluated by CHIP analysis in HPV-positive (TL-1) and HPV-negative (TL-4) cells. Chromatin was isolated and immunoprecipitated with an antibody specific for c-Myc and Sp-1. SiHa cells were used as a positive control. P: parental control, N: negative control, and SiE6: the cells were transfected with E6 RNAi.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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

<p>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</p> <p> <input checked="" type="checkbox"/> 達成目標</p> <p> <input type="checkbox"/> 未達成目標（請說明，以 100 字為限）</p> <p> <input type="checkbox"/> 實驗失敗</p> <p> <input type="checkbox"/> 因故實驗中斷</p> <p> <input type="checkbox"/> 其他原因</p> <p>說明：</p>
<p>2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：</p> <p> 論文：<input checked="" type="checkbox"/> 已發表 <input type="checkbox"/> 未發表之文稿 <input type="checkbox"/> 撰寫中 <input type="checkbox"/> 無</p> <p> 專利：<input type="checkbox"/> 已獲得 <input type="checkbox"/> 申請中 <input type="checkbox"/> 無</p> <p> 技轉：<input type="checkbox"/> 已技轉 <input type="checkbox"/> 洽談中 <input type="checkbox"/> 無</p> <p> 其他：（以 100 字為限）</p>
<p>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）</p> <p>本計畫的研究成果發現環境汙染物暴露和HPV感染之交互作用，會經由抑制XRCC3及XRCC5修補基因的表現而增加染色體不穩定頻率，並進而導致hTERT及c-myc基因的活化而參與不抽菸者肺癌的形成，尤其是台灣不抽菸婦女的肺癌形成。</p>

Human Telomerase Reverse Transcriptase Activated by E6 Oncoprotein Is Required for Human Papillomavirus-16/18-Infected Lung Tumorigenesis

Ya-Wen Cheng,¹ Tzu-Chin Wu,^{1,3} Chih-Yi Chen,⁴ Ming-Chih Chou,⁵ Jiunn-Liang Ko,² and Huei Lee²

Abstract **Purpose:** Our recent report indicates that human papillomavirus (HPV)-16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung tumors and is related to p53 inactivation. We further explored whether human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription is up-regulated by E6 and contributes to lung tumor development.

Experimental Design: Immunohistochemistry detected HPV-16 E6 oncoprotein in 135 lung tumors, and hTERT mRNA was evaluated by real-time reverse transcription-PCR and *in situ* hybridization, respectively. A small RNA interference (RNAi), Western blotting, and chromatin immunoprecipitation analysis were used to clarify whether hTERT transcription was regulated by c-Myc and Sp1. The telomerase activity and oncogenic potential of TL-1 with or without E6- or hTERT-RNAi was determined by real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol analysis and soft-agar assay, respectively.

Results: hTERT mRNA levels in E6-positive tumors, which were prevalent in females, nonsmokers, and adenocarcinomas, were significantly higher than in E6-negative tumors. In addition, hTERT mRNA levels in early tumors (stage I) were greater than levels in advanced tumors (stages II and III). Chromatin immunoprecipitation assay showed that Sp1 cooperated with c-Myc to activate hTERT transcription in TL-1 cells, which was similar to the SiHa cells. The telomerase activity of the TL-1 cells decreased concomitantly with the transfection of various doses of E6- or hTERT-RNAi. A soft-agar assay showed that the oncogenic potential of TL-1 cells was significantly reduced after being transfected with E6-RNAi. Moreover, a colony of TL-1 cells could not form after transfection with hTERT-RNAi.

Conclusion: Transcriptional activation of hTERT by E6 oncoprotein is required for HPV-16/18-infected lung tumorigenesis.

Telomerase activity is detected in >90% of immortalized and Although various post-transcriptional and post-translational

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/26

國科會補助計畫	計畫名稱: 環境暴露與人類乳突瘤病毒感染交互作用與台灣不抽煙肺癌形成之相關性
	計畫主持人: 鄭雅文
	計畫編號: 97-2314-B-040-010-MY3 學門領域: 公共衛生及環境醫學
無研發成果推廣資料	

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：鄭雅文		計畫編號：97-2314-B-040-010-MY3				計畫名稱：環境暴露與人類乳突瘤病毒交互作用與台灣不抽煙肺癌形成之相關性	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	100%		
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

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

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

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

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

本計畫的研究成果發現環境汙染物暴露和 HPV 感染之交互作用，會經由抑制 XRCC3 及 XRCC5 修補基因的表現而增加染色體不穩定頻率，並進而導致 hTERT 及 c-myc 基因的活化而參與不抽菸者肺癌的形成，尤其是台灣不抽菸婦女的肺癌形成。