

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## XPC 基因在肺癌腫瘤化之角色研究(3/3) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-001-  
執行期間：96年08月01日至97年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：李輝

計畫參與人員：博士後研究：吳怡慧

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 97年09月16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

(計畫名稱)

XPC 基因在肺癌腫瘤化之角色研究

計畫類別：■ 個別型計畫 □ 整合型計畫

計畫編號：NSC -94 -2314-B-040-001

執行期間：96 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

計畫主持人：李輝

共同主持人：

計畫參與人員：吳怡慧

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：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

中華民國 97 年 9 月 16 日

## 目錄

1、中文摘要	3
2、英文摘要	4
3、報告內容	5
3.1 前言	5
3.2 文獻探討	5
4、研究材料與方法	10
5、結果	20
6、討論	25
7、參考文獻	28
8、表與圖	32

## 1、中文摘要

已知 DNA 修補能力 (DRC) 降低與肺癌形成有關，尤其是不抽菸者。XPC 是第一個認知 DNA 傷害之 nucleotide excision repair 的蛋白。動物模式研究發現剔除 XPC 基因之小鼠會造成肺腺癌之形成。又知 p53 可做為 XPC 之轉錄因子會促進 XPC 的表現。但是本研究之初步之結果卻發現，既使 p53 發生突變之肺腫瘤組織和肺癌細胞中還是能偵測得到 XPC mRNA 與蛋白的表現，因此推測可能有其他機制參與調控 XPC 基因的表現。本研究假設在肺腫瘤化過程中，XPC 可能會經由啟動子甲基化而降低 DRC，可能會引起 p53 發生突變，進而參與肺癌形成。首先本研究以 reporter assay 證明 XPC 啟動子 -175/-1 序列是主要調控 XPC 基因轉錄之啟動子序列。以 Methylation specific PCR, HpaII-based PCR 和 Bisulfite sequencing 三種方法都發現五株 p53 突變或缺失之肺癌細胞中，有四株 (H1355、Calu-1、H441 和 H661) 發生啟動子甲基化。以 5-aza-dC 去甲基化藥物處理 Calu-1 和 H441 細胞株，XPC mRNA 會重新表現。為了解 XPC 甲基化在肺癌患者與 p53 突變以及與患者臨床因子之相關性，本研究分析 158 位肺癌患者之 XPC 啟動子甲基化，結果 34% 的患者有 XPC 甲基化，其中不抽菸者高達 41%，顯著高於抽菸者 (22%， $P = 0.010$ )。又以 RT-PCR 與免疫染色偵測肺腫瘤之 XPC mRNA 與蛋白表現發現其與 XPC 甲基化呈負相關 ( $P < 0.001$ )，而 XPC mRNA 與其蛋白亦呈正相關 ( $P < 0.001$ )。本研究發現 p53 突變肺癌患者之 XPC 甲基化的發生頻率較 p53 正常者為高 (42 vs. 28%， $P = 0.070$ )。本研究為了解 XPC 去活化是否會參與肺腫瘤之轉移而造成患者之預後較差？本研究以 RNAi 技術將 CL-1-0 肺癌細胞之 XPC 基因剔除，會造成與肺轉移相關 CRMP-1 與 CTGF 蛋白表現量降低；而在 XPC 過度表現之 CL-1-5 細胞的表現則有回復的現象。此外，動物實驗亦證實過度表現 XPC 基因會降低 CL-1-5 細胞的轉移能力。本研究以 real-time RT-PCR 分析 128 位肺癌患者之 XPC mRNA 表現量，發現 XPC mRNA 高表現量的肺癌患者之存活率顯著高於 XPC mRNA 低表現者 (40.32 vs. 32.81%， $P = 0.0440$ )。以多變項之 Cox's regression 分析結果發現，XPC mRNA 低表現的罹患肺癌之風險是高表現者的 1.885 倍，此相對風險值 (RR) 和腫瘤期別的 RR 相近，因此 XPC mRNA 表現量適合做為肺癌患者之獨立的臨床預後指標。總之，本研究發現 XPC 啟動子 -175/-1 序列發生甲基化是抑制 XPC 表現的主要調控機制，而 XPC 去活化會造成癌細胞轉移，加速肺腫瘤惡化。

## 2、英文摘要

Reduced DNA repair capability is associated with developing lung cancer, especially in nonsmokers. XPC participates in the initial recognition of DNA damage during the DNA nucleotide excision repair process. Homologous deletion of XPC gene frequently causes lung adenocarcinoma in mice, suggesting that an XPC defect may play a critical role in lung tumorigenesis. p53 has been demonstrated to activate XPC transcription under UV exposure. However, XPC mRNA and protein expressions were detected in lung cancer cells and tumors harbored with p53 mutations. Therefore, transcriptional regulation other than p53 could be involved in XPC transcription. It was hypothesized that inactivation of XPC by promoter hypermethylation may play an important role in the reduction of DNA repair capability to cause p53 mutation during lung carcinogenesis. In this report, it was demonstrated that hypermethylation of 17 CpG islands between -175 and -1 of the XPC promoter correlated very well with XPC expression levels in eight lung cancer cell lines. When cells with hypermethylated XPC promoters were treated with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine, XPC expression was de-repressed. Interestingly, XPC hypermethylation was found in 4 of 5 (80%) lung cancer cell lines harbored p53 mutation (H1355, Calu-1, H441, and H661), but not observed in two lung cancer cells which had a wild-type p53 gene (A549 and CH27). Among the analysis of the hypermethylation status of 158 lung tumors, XPC hypermethylation is more common in nonsmokers (39 of 94, 41%) than in smokers (14 of 64, 22%;  $P = 0.010$ ). Additionally, XPC hypermethylation is more often with G to T or C mutations in the p53 gene. These results show that hypermethylation of the XPC promoter may play a crucial role in XPC inactivation, which may partly contribute to the occurrence of p53 mutations during lung tumorigenesis, especially nonsmokers. It was further investigated whether reduced XPC mRNA levels predict the clinical outcome of lung cancer patients. The expression of XPC was reduced with increasing invasive potential in CL-1-0 lung cancer cell lines. When the XPC level was reduced by RNAi, cell migration and invasiveness increased markedly; the increased invasiveness may be caused by decreased expression of CRMP-1 and CTGF. In addition, when XPC overexpressed CL-1-5 cells were tail vein injected into nude mice, none of the animals developed lung metastasis. To elucidate whether reduced XPC expression correlated with tumor aggressiveness and poor patient survival, XPC mRNA levels were evaluated by real-time RT-PCR. Kaplan-Meier analysis showed that the median survival of patients with lower XPC mRNA levels was shorter compared with patients having higher XPC mRNA levels ( $P = 0.0440$ ). Cox regression analysis further indicated that XPC mRNA level may act as an independent prognostic factor for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients ( $P = 0.014$ ). Reduced XPC mRNA level may constitute an independent prognostic factor for NSCLC patients. Taken together, XPC inactivation by promoter methylation might not only contribute to p53 mutation during lung tumorigenesis, but also participate to lung tumor invasion.

### 3、報告內容

#### 3.1 前言

根據衛生署民國九十五年統計資料指出，惡性腫瘤為國人十大主要死因之冠，其中又以肺癌和肝癌為主。在台灣女性肺癌之死亡率，自民國七十五年以來，已經超過子宮頸癌，躍居女性惡性腫瘤死亡的首位癌症。由過去統計資料顯示，在 1955 年男性與女性的肺癌死亡率每十萬人分別為 2.67 人和 1.25 人，但根據衛生署 2000 年資料指出，男性與女性肺癌死亡率驟升至每十萬人分別為 38.69 人和 17.25 人，在這四十餘年間，暴增了 14 至 15 倍 (Department of Health, ROC, 1984 ~ 2000)。

自 1980 年代開始，美國男性的肺癌死亡率已逐漸趨緩，但仍高居美國男性首位癌症死因。而美國女性的肺癌死亡率卻有逐年升高之趨勢。早在 1987 年開始，肺癌就已超越乳癌成為美國女性的首要癌症死因 (Greenlee et al., 2001)。因此無論在台灣或是美國，肺癌的防制都是重要的醫學研究之課題。

肺癌依組織形態主要區分為兩大類型：小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 與非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)。小細胞肺癌大多發生於男性，且與抽菸有密切關係，佔全部肺癌的 20% 左右。臨床上，因小細胞肺癌生長快速，在罹患小細胞肺癌初期時，即具有擴散性，而不易以外科切除的方式治療，因此大多以化學藥物合併放射線治療為主。非小細胞肺癌依據腫瘤細胞的型態可以分成三種：鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinomas)、腺癌 (adenocarcinomas) 與大細胞癌 (large cell carcinomas) 等三種。在台灣，男性肺癌以鱗狀上皮細胞癌為主；女性肺癌則以腺癌為主 (Lee et al., 2000)。非小細胞肺癌約佔肺癌的 80% 左右，此型肺癌之腫瘤生長較慢，擴散轉移的能力也較慢。在臨床上大多以手術切除的方式治療。至今肺癌患者的預後狀況還是相當的差，5 年的存活率大多低於 15% (Zöchbauer-Müller et al., 2002)。以現有的診斷方式，要在早期發現仍是相當困難的工作，但早期肺癌發現對於肺癌之預後與治療效果都具有關鍵性的影響。因此以分子生物技術探討肺癌之致病分子機轉，並試圖建立肺癌的早期診斷、預後之生物指標以及尋找臨床治療之標的基因，是當前減少肺癌發生和提高肺癌之治療效果的有效之積極策略。

#### 3.2 文獻探討

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。其中肺癌則分別位居男、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 人是死於肺癌，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)。台灣女性抽菸的比例較男性低的多，其比例約為女性：男性 = 3：60%，即 1：20，而其他歐美國家約為 85：35%，即 17：7 (Koo et al., 1990)。雖然眾所皆知抽菸是引起肺癌的主要原因，但台灣的肺癌患者之抽菸習慣來分析，80% 之男性病因可歸因於抽菸，但女性肺癌則有 85% 以上之患者，無法以抽菸來解釋。所有癌症的死亡原因約有 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，因此其他環境因子參與肺癌的形成，是當今重要

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 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., 1996; 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，近年來香菸消費總額雖逐年增加，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，因此抽菸行為無法完全說明都會區民眾為何有較高罹患肺癌之危險性 (Tay et al., 1988)。以上敘述均可說明，雖然香菸是引起肺癌的主要因子。但可預期不抽煙肺癌之致病分子機轉將有別於抽菸者。

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 是廣泛存在環境中的污染物，進入體內後會經生物轉換作用將其代謝成 diol epoxide 型的代謝產物，並與 DNA 以共價結合形成 PAH-DNA 鍵結物。Nucleotide excision repair (NER) 是主要移除 PAH-DNA 鍵結物的修補系統。NER 區分為兩個路徑：Transcription couple repair (TCR) 與 Global genomic repair (GGR)。修補過程首先由 XPC、XPA、RPA 和 XPC-HHR23B 等蛋白認知 (recognition) 附著於受損傷的位置，接著由 XPB 和 XPD 兩個核酸螺旋酵素 (DNA helicase) 分別由 5' 端和 3' 端將受損傷的 DNA 雙股打開 (Schaeffer et al., 1993, 1994)，然後 ERCC1/XPF 和 ERCC5/XPG 兩個核酸內切酵素 (endonuclease) 分別切 5' 端和 3' 端受損傷部位 (Mu et al., 1996)。最後 RPA 負責穩定單股 DNA，由 DNA 聚合酵素  $\epsilon$  和  $\delta$ 、PCNA 利用未受損傷的一股當模板，合成正確的鹼基對，再由 DNA 接合酵素 (DNA ligase) 接上切口後完成核酸修補 (Coverley et al., 1992)。

NER 修補系統的基因可能參與肺組織中 DNA 鍵結物之移除。Li 等人 (2001) 發現，肺癌患者 BPDE-DNA 鍵結物含量 ( $93.2 \pm 89.3$  adducts/ $10^7$  nucleotides) 顯著高於健康之控制組 ( $63.7 \pm 61.1/10^7$  nucleotides) ( $P=0.001$ )。Rajae 等人 (2001) 的報告指出，非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者之 DNA 修補能力 (DNA repair capacity, DRC) (67%) 低於健康者 (79.3%) ( $P<0.0004$ )。因此肺癌患者對致癌物的敏感性較高，可能與移除 BPDE-DNA 鍵結物之能力較低有關，進而造成 p53 基因發生之頻率增高，而導致肺癌之形成。

不同個體的修補能力差異可能是修補基因的表現不同所致 (Li et al., 1993; Rudiger et al., 1989)，因此修補基因的表現可能成為修補能力或癌症敏感性的指標。已有研究指出修補基因的表現程度與癌症發生有關。Wei 等人 (1998) 發現 hMLH1 與 hMSH6 修補基因表現降低，可以當做頭頸部癌發生的危險指標。Wu 等人 (2001) 的報告指出，增加 MGMT 修補基因的表現，會降低抗癌藥-BCNU 對肺細胞的細胞毒性。又發現白血病患者之 ERCC1 基因的表現會降低。Welsh 等人 (2004) 發現在睪丸癌細胞株中，XPA、ERCC1 和 XPF 等參與 NER 的修補基因之蛋白表現有降低的趨勢。因此多種癌症的 DNA 修補基因表現都有減低的現象，進而降低 DNA 修補能力 (Cheng et al., 2000; Hou et al., 2002; Hu et al., 2004)。本研究室初步以 RT-PCR 分析五種參與 NER 之修補基因 mRNA 表現包括 ERCC1, ERCC3, ERCC5, ERCC6 和 XPC，結果發現 XPC mRNA 之表現頻率顯著低於非癌症患者，且不抽煙之肺癌患者之 XPC mRNA 之表現頻率低於抽煙肺癌患者。且發現 XPC mRNA 表現與淋巴結轉移有關，更有趣的是也發現，XPC mRNA 表現與否與患者之預後有關 (吳怡慧 2001

碩士論文)。因此推測 XPC 基因發生轉錄不活化可能與肺癌形成有關，尤其是不抽煙者。本計畫將由探討 XPC 轉錄調控之機轉，了解 XPC 基因之去活化與肺腫瘤形成之相關性。

Xeroderma pigmentosum group C (XPC) 位於人類染色體 3p25.1 的位置，全長為 33Kb，含有 15 個 exon，可轉譯出 940 個胺基酸。主要參與 GGR，會與 HHR23B 蛋白形成穩定的複合體，認知由 UV、PAH 或 cisplatin 所造成的 DNA 損傷位置 (damage recognition)，而參與 NER 的起始步驟 (Sugasawa et al., 1998)。Mitsuo 等人 (1998) 發現 NER 開始進行時，XPC 會先與 HHR23B 形成複合物，認知 DNA 受損的位置，在進行切割作用 (incision) 時，XPC/HHR23B 複合物會離開受損傷的 DNA 位置，使 XPG/ERCC5 與 DNA 鍵結進行切割作用。XPC 會與其他蛋白作用，如 transcription factor IIIH (TFIIH) 和一種 centrisomal protein --centrin 2 / caltractin 1 (CEN2)。Marito 等人 (2001) 指出，CEN2 是 XPC/HHR23B 複合物的一員，它會增強 HHR23B 穩定 XPC 蛋白的功能，會直接與 XPC 作用進行 NER 修補。XPC 與 CEN2 之間的作用不僅參與 NER 同時也與細胞分裂有關。此外 Bonnie 等人 (1998) 發現，NER 進行過程須要將 nucleosome 打開，因此正常細胞之 XPC 具有打開 nucleosome 的功能。

動物實驗證實 XPC 基因剔除的老鼠，會造成 NER 缺失，對紫外線特別敏感，若以化學致癌物 AAF 或其衍生物 NOH-AAF 餵食三種不同之 XPC<sup>+/+</sup>、XPC<sup>+/-</sup>與 XPC<sup>-/-</sup>基因型的老鼠，結果發現 XPC<sup>-/-</sup>的老鼠在肝臟或肺臟發生腫瘤之頻率 (17/30, 57%) 遠高於 XPC<sup>+/+</sup>、XPC<sup>+/-</sup>基因型 (4/24, 17%; 5/64, 8%) 的老鼠。由此結果可知，具有 XPC<sup>-/-</sup>基因型的老鼠對於化學致癌物較敏感，容易引起惡性腫瘤之形成 (Friedberg et al., 1999)。

DNA 修補基因有基因多形性的現象，可能會影響 DNA 修補之能力，因此推測 DNA 修補基因之多形性可能與癌症發生有關。過去研究指出，XPC 基因在 intron 9 和 exon 15 會發生基因多形性。Shen 等人 (2001) 分析 287 個頭、頸癌患者與 311 個非癌症者之 XPC intron 9 基因多形性，結果發現癌症患者發生 XPC-PAT<sup>+</sup> allele 的頻率顯著高於非癌症者 (P=0.007)，因此 XPC 基因多形性會增加罹患頭頸癌的危險性。Sanyal 等人 (2004) 分析膀胱癌患者之 XPC exon 15 基因多形性，結果發現癌症患者之基因型為 A/C 危險型之頻率遠高於非癌症者 (OR 1.49, 95% CI 1.16~1.92, P=0.001)。本研究室初步 case-control 之研究結果，已發現 XPC 基因形性與台灣肺癌之發生可能沒有相關性。因此排除 XPC 發生基因多形性與肺癌形成之可能關係。

在人類腫瘤的形成過程中，p53 抑癌基因經常發生基因突變或蛋白表現異常。目前已知會造成 p53 蛋白失去功能的原因有下列幾種：一是 p53 基因發生突變；另一個重要的原因是因為有其他蛋白與 p53 結合。由過去的研究結果得知，約有 73% 的小細胞肺癌患者及 45% 的非小細胞肺癌患者之 p53 基因發生突變，主要發生在 exon 5~8 (Gao et al., 2003)。過去研究指出，DNA 修補功能缺失是造成 p53 基因突變的主要原因之一，例如：MGMT 為一個修補基因，其啟動子發生甲基化會造成此基因去活化，而增加 p53 基因發生 G→A 的突變 (Zhang et al., 2003)。此外轉染 XPC 基因到 XPC 缺失的細胞株，此細胞不會完全恢復修補能力，但是會有效的移除發生在 p53 基因上的 cyclobutane pyrimidine dimer 錯誤鹼基。Adimoolam 等人 (2003) 利用 UV 照射轉染 p53 的 HCT116 大腸癌細胞，發現 XPC 的促進子上具有 p53 的結合位，當細胞受到傷害後，p53 會與 XPC-p53 response element 結合，進行 DNA 修補。Wang 等人 (2003) 發現，當細胞受到 UV 照射後，p53 表現的細胞之 XPC 與 TFIIH 修補蛋白會快速移到受損傷的 DNA 位置進行修補；而 p53 不表現的細胞則無此現象。又動物實驗發現，XPC 剔除的老鼠，又同時 p53 發生突變，則會顯著增加老鼠發生



皮膚癌的機會 (Reis et al., 2000)。由上述結果得知，p53 是 XPC 的轉錄因子，在調控 XPC 轉錄上扮演重要角色。已知肺癌經常發生 p53 基因突變，因此本計畫擬探討台灣肺癌患者 XPC 的表現有多少是經由 p53 基因突變，而造成無法表現？因此擬利用 DNA 定序方法 (DNA sequence) 分析肺癌患者 p53 基因是否發生突變？並統計分析 XPC 基因表現與否與 p53 基因突變之間是否具有相關性？以釐清 p53 基因突變與 XPC 基因表現，在肺腫瘤形成過程中是否扮演重要之角色？

抑癌基因促進子甲基化 (Promoter methylation) 是造成抑癌基因功能喪失的一種主要機轉。已知在肺癌形成的過程中，有超過四十種基因會發生促進子甲基化，這些基因包括有參與調控細胞週期、DNA 修補以及一些已知抑癌基因 (Tsou et al., 2002)。但至今尚無 XPC 基因啟動子甲基化之研究報告，因此本計畫擬探討 XPC 基因啟動子發生甲基化是否與肺癌的形成。本計畫將利用 DNA 定序方法 (DNA sequence) 確定 XPC 基因啟動子發生甲基化的位置，再利用 MSP 方法，分析非癌症控制組與肺癌患者之肺組織中 XPC 基因啟動子甲基化頻率有何不同？以了解肺腫瘤組織之 XPC 基因啟動子甲基化之頻率，是否較非癌症之正常肺組織為高，而造成 XPC 基因無法表現，進而參與肺癌的形成。同時亦將利用去甲基化藥物處理肺癌細胞株，以了解 XPC 基因會再度表現，以確定在肺癌細胞之 XPC 基因促進子發生甲基化，是造成 XPC 基因不表現的主要原因。因此本計畫之結果將有助於釐清 XPC 基因啟動子甲基化，是否參與調控 XPC 基因之轉錄活化，而導致肺癌之形成。

治療肺癌的方法包括：手術切除、化學治療、雷射治療與以免疫療法做為輔助治療，但是肺癌病患的存活率仍低於其他癌症，其主要原因是轉移 (metastasis) 所造成 (Greenlee et al., 2001)。肺癌常轉移至多個器官，常見的依序為腦、腎上腺、肝、骨骼及腎。癌症轉移是複雜的過程，轉移首先從侵犯 (invasion) 開始。癌細胞破壞基底膜 (basal membrane) 侵入周圍的組織，隨後進入血液或是淋巴球到達更遠的組織和其他內臟器官，在新位置生長形成新的癌 (Kalluri et al., 2003)。當細胞轉變成癌細胞時，細胞會不斷 DNA 複製、降低細胞生長調控的敏感性、逃脫細胞的凋亡、誘發癌細胞組織周圍的血管增生以供應足夠的養分，另外提升癌細胞組織周圍組織的侵犯和轉移。

癌細胞在進行轉移時，會誘發基底膜蛋白水解酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的分泌，以瓦解細胞間的黏附分子 (adhesion molecules, 如：ICAM、Selectin 和 Integrin)，開始脫離細胞原始的位置，到達其他的地方。在這個過程中會伴隨癌細胞內部訊息傳遞分子 (如：catenin) 不斷誘發細胞骨架的重組和增加 MMPs 的分泌，並且也引發細胞在轉移時具有抗細胞死亡的訊息。Murakawa (2004) 以 microarray 方法分析淋巴結轉移 (lymph node metastasis) 的肺癌病患檢體，結果發現  $\beta$ -catenin (Hommura et al., 2002; Lee et al., 2002) 與 integrin  $\beta$ 1 (Takenaka et al., 2000) 的表現會增加；而參與修補作用的基因 MLH1 (Chang et al., 2000) 表現則降低，這些基因表現量的改變會造成肺癌惡化 (malignancy)，其中 integrin  $\beta$ 1 是細胞外基質 (extracellular matrix) 的受器，而  $\beta$ -catenin 的功能是傳遞細胞之間訊息，兩者與癌症轉移有著密不可分的關係 (Pignatelli et al., 1998)。

Gemma 等人 (2001) 利用 microarray 方法分析不同轉移能力的 pulmonary adenocarcinoma 細胞 (PC9、PC/f9、PC/f14)，發現轉移能力較強的細胞 (PC/f9、PC/f14) 其 matrix metalloproteinases-2 (MMP-2)、PAI-1 與 IL-1 $\alpha$  這些與訊號傳遞、生長因子有關的基因其表現有增加的趨勢，而 carcinoembryonic antigen (CEA)、caspase 5、Fas ligand、cyclin E、cyclin B1、Ki-67、PCNA 等與調控細胞週期、促進細胞凋亡相關基因的表現有降低的現象。Shih 等人 (2001) 同樣以 microarray 方法，分析不同轉移能力的肺癌細胞株 (CL-1-0、CL-1-1、

CL-1-5)，結果發現隨著轉移能力增加，collapsin response mediator protein (CRMP-1) 的表現則會逐漸降低；同時發現肺癌患者之肺腫瘤組織 CRMP-1 基因的表現與淋巴結轉移臨床因子，具有統計上的相關性，而且 CRMP-1 基因表現的肺癌患者之存活率高於 CRMP-1 不表現的患者，由以上結果得知，CRMP-1 參與肺腺癌抑制侵入(invasion-suppressor)的基因。Connective tissue growth factor (CTGF) 為一個分泌型的生長因子，會與細胞表面的 integrin 結合。Chang 等人 (2004) 將 CTGF 轉染至 CL-1-5 轉移能力較強的細胞，然後將此轉染之細胞，由尾靜脈注射入 SCID 老鼠體內，了解其腫瘤轉移能力是否改變，結果發現 CTGF 轉染細胞之侵襲與轉移的能力顯著被抑制，並發現 CTGF 會活化 CRMP-1 基因的表現，而抑制腫瘤細胞之侵襲與轉移的能力。本研究之初步結果已發現，XPC mRNA 之表現與肺腫瘤之淋巴結轉移有關，同時亦發現 XPC mRNA 表現與否可做為肺癌患者之預後指標。因此本研究計畫擬探討 XPC 基因與 CTGF 與 CRMP-1 基因表現之相關性，以及上述已知有關腫瘤轉移之基因例如 cyclin B1, cyclin E, MMP-2, PAI-1 等做為參考基因，以釐清 XPC 參與肺腫瘤化之路徑。

在發育生物學的研究中，常於線蟲 (*C. elegans*)、果蠅或酵母菌，用來降低特定基因表現的方法—RNA 干擾(RNA interference, 簡稱 RNAi) 技術，可以有效的應用於抑制 HIV 病毒的感染與複製上。RNA 干擾現象 (RNA interference, 簡稱 RNAi)，在 1998 年首度於線蟲中發現，利用雙股的 RNA (dsRNA) 並將其送到細胞中後，dsRNA 會被一種名為 Dicer 的酵素分解成許多小片斷。這些小片斷的 RNA (Short interfering RNA, 簡稱 siRNAs) 結合到特定序列之 RNA 上，引發 RNA 序列的降解，使 mRNA 無法轉譯蛋白質，造成該特定基因 silencing，失去功能。目前此技術被廣泛應用在癌症研究與治療應用上，以 RNAi 抑制一些 oncogene，例如 K-ras (Kawasaki et al., 2003)、突變型 p53 (Martinez et al., 2002)、Her2/neu (Choudhury et al., 2004) 與 bcr-abl (Scherr et al., 2003)，可減少腫瘤發生。降低 MDR1 此抗藥基因的表現可以減少抗藥性的發生 (Nieth et al., 2003)。將 Fas-RNAi 的細胞株送入老鼠體內可有效的抑制由 Con-A 所造成的肝炎 (Song et al., 2003)。同樣以動物模式發現，抑制 VEGF 可以降低 pathologic ocular angiogenesis (Reich et al., 2003)。因此本計畫亦將利用 RNA 干擾技術建立 XPC knock-down 的肺癌細胞株，將選用具有不同腫瘤侵襲與轉移能力之肺癌細胞株 CL-1-0, CL-1-1 和 CL-1-5 來進行肺腫瘤侵襲與轉移實驗。CL-1 系列細胞株是由多次的體外侵襲實驗 (in vitro invasion assay) 所篩選出一系列侵襲及轉移能力越來越強的肺腺癌細胞。本研究亦將 XPC RNAi 細胞株進行動物轉移實驗，並分析這些細胞株之轉移有關基因如 CRMP-1、CTGF、MMP-2 和 PAI-1 的表現情形，以釐清 XPC 基因在肺腫瘤化過程中，尤其是腫瘤侵襲與轉移上所扮演的角色與其可能路徑。

## 4、研究材料與方法

### 4.1 人類肺癌細胞株來源

A549、H1299、Calu-1、H23 及 H1355 細胞株購自於 ATCC；H441 及 H661 細胞株購自於食品工業發展研究所菌種中心國家衛生研究院細胞庫；CH27 細胞株由台中榮民總醫院徐士蘭博士所贈與；CL-1-0、CL-1-1、CL-1-3 及 CL-1-5 細胞株由台灣大學醫學院楊泮池醫師所贈與。

### 4.2 組織檢體來源

本次研究所選取的非小細胞肺癌之腫瘤及非腫瘤組織，皆由台中榮民總醫院胸腔外科在 1993 年至 2002 年間進行手術取得，本實驗採用的腫瘤分期，是依據 TNM：即腫瘤大小 (tumor size)、是否有淋巴結轉移 (node involvement)、以及是否有遠端轉移 (metastasis) 來決定其腫瘤分期。肺癌患者腫瘤組織之切片則由台中榮總病理部提供。

### 4.3 肺組織 RNA 萃取

將適當大小之組織，置於研鉢中，加入液態氮將組織磨碎後，將磨碎之組織移至 1.5 ml 離心管中，再加入 1 ml TRIzol 於室溫反應 15 分鐘以便水解組織，待組織完全水解後加入 200  $\mu$ l 氯仿 (chloroform) 混合均勻，以 12,000 rpm 離心 15 分鐘後，取上清液加入 500  $\mu$ l isopropanol 於室溫反應 15 分鐘後，將 RNA 沉澱出來，經 12,000 rpm 離心 20 分鐘後，除去上清液，加入 1 ml 75% 酒精去除殘留的鹽類與 isopropanol，經離心留下 RNA 沉澱物，溶於 DEPC H<sub>2</sub>O。

### 4.4 定量 PCR (real-time RT-PCR)

取 5  $\mu$ g RNA 以 200 pmole/ $\mu$ l 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  $\mu$ l 反轉錄酵素反應 buffer、1  $\mu$ l 0.1M DTT 及 1  $\mu$ l 10 mM dNTP 在 42°C 作用 2 分鐘後，再加入 1  $\mu$ l 反轉錄酵素 (Reverse transcriptase)，在 42°C 作用 2 小時，合成 cDNA 用做 PCR 分析用。利用 ABI prism 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystems) 進行定量 PCR。取 SYBR Green PCR master mix (Invitrogen) 12.5  $\mu$ l 與 primer mixture 2  $\mu$ l，補水至 20  $\mu$ l，之後加入 5  $\mu$ l 的 cDNA。使用的 primer 序列如下：XPC sense：5'-AAGACTTGGAGTTTCAGGCAAAA-3'，XPC anti-sense：5'-TCAGGAGATGCCGCTTCAG-3'；GADD45 sense：TCAGCGCACGATC ACTGTC，GADD45 anti-sense：CCAGCAGGCACAACACCAC；BAX sense：CCAGCAGGCACAACACCAC，BAX anti-sense：CCAGCAGGCACAACA CCAC；MDM2 sense：CCAGCAGGCACAACACCAC，MDM2 anti-sense：CCAGCAGGCACAACACC AC；18S rRNA sense：TCGGAAGTGGAGCCATGA，18S rRNA anti-sense：CCGGTCGGCATCGTTTA。本實驗以 18S rRNA 做為 internal control。基因相對表現量為  $2^{-\Delta C_t} \times K$ ， $K=10^4$ ， $[-\Delta C_t = -[C_{t(\text{Target gene})} - C_{t(18S \text{ rRNA})}]]$ 。

### 4.5 肺組織 DNA 的萃取

將肺癌病患肺組織置於含有 0.5 ml lysis buffer 【10 mM Tris buffer pH 8.0、100 mM NaCl、0.5 % SDS、25 mM EDTA pH 8.0】的 1.5 ml 離心管中，先將組織剪碎，再加入 10 mg/ml 的 proteinase K 10  $\mu$ l，置於 56°C 作用 18 個小時，使組織完全水解。再加入 0.5 ml phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25:24:1) 均勻混和後，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至一新的離心管中，重複以上步驟 1~2 次。再以 chloroform / isoamyl alcohol (24:1) 萃取一次，洗去殘留的 phenol。取上清液加入 1/10 倍體積的 3M NaOAc 與 2 倍體積的 100% 酒精，均勻混和後，置於 -20°C 冰箱 30 分鐘，以沉澱 DNA。以 12,000 rpm 離心

10 分鐘後去除上清液，再加入 75% 酒精洗去多餘的鹽類，最後將 DNA 溶於滅菌水並保存至 -20°C 冰箱。之後以紫外線光譜儀測定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光值，其吸光值 A260/A280 的比值應在 1.6 到 1.8 之間。DNA 的濃度以下列公式計算：DNA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = A260  $\times$  50  $\times$  稀釋倍數。

#### 4.6 p53 突變序列分析

取 100 ng DNA 為模板進行 PCR 反應，PCR 反應條件如下：100 ng DNA、0.5 mM dNTP、5  $\mu\text{l}$  PCR 10X reaction buffer、2.5U Taq polymerase、0.5 mM primer。PCR 反應步驟，denaturing 94°C 40 秒，annealing (Exon 5 和 6 為 54°C 40 秒；Exon 7 和 8 為 60°C 40 秒)，elongation 72°C 40 秒，此循環重複 35 次，最後以 72°C 反應 10 分鐘。將此 PCR 產物以 GENECLEAN III KIT (BIO 101,USA) 純化。PCR 所用 primer 序列如下：Exon 5 sense : 5`-TTCAACTCTG TCTCCTTCCT-3` , anti-sense : 5`-CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG-3` ; Exon 6 sense : 5`-GCCTCTGATTCCTCACTGAT-3` , anti-sense : 5`-TTAACCCCTC CTCCCAGAGA-3` ; Exon 7 sense : 5`-AGGCGCACTGGCCTCATCTT-3` , anti-sense : 5`-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3` ; Exon 8 sense : 5`-TTCCTTACTG CCTCTTGCTT-3` , anti-sense : 5`-AGGCAT AACTGCACCCTTGG-3` 。

#### 4.7 自動定序反應的製備 (autosequencer)

在 0.5 ml 離心管中分別加入 1.5  $\mu\text{l}$  的 5X sequencing reaction buffer、引子 (3.2 pmol)、模板 (0.5  $\mu\text{g}$  的質體 DNA)、1  $\mu\text{l}$  的 BigDye<sup>R</sup> terminator v3.1 (Applied Biosystems)，最後補水至 10  $\mu\text{l}$  並混合均勻。放入 PCR 機器，反應設定如下：96°C 30 秒；55°C 15 秒；60°C 4 分鐘，重複 24 個循環，最後讓反應停留在 4°C。待反應結束後，將產物 10  $\mu\text{l}$  轉移到 1.5 ml 離心管，並分別加入 1.5  $\mu\text{l}$  的 3M 醋酸鈉(sodium acetate)、7.2  $\mu\text{l}$  的二次水及 33  $\mu\text{l}$  的 95% 酒精，混合均勻後放於室溫 15 分鐘，12,000 rpm 4°C 離心 20 分鐘，之後去上清液並加入 200  $\mu\text{l}$  75% 酒精，12,000 rpm 4°C 離心 5 分鐘，去上清液後自然風乾。加入 10  $\mu\text{l}$  denature solution HiDi (Applied Biosystems) 溶 pellet，加溫至 95°C 3 分鐘後置於冰上待上機。

#### 4.8 XPC promoter 片段分析

##### 4.8.1 pGL-3 載體與各部分 XPC promoter 片段的構築

取 A549 1  $\mu\text{g}$  DNA 做為模板與各種 XPC 引子進行 PCR。並由 agarose gel 中回收 DNA 片段 (DNA Elution)，與 TA 載體進行接合並進行轉形作用，最後抽取質體做定序分析。sense primers 序列 p2536 : 5`-GCACAGGTTGAGTTTAGG CT-3` ; p1174 : 5`-ATTTTTTGAGTGTTTCCAGCA-3` ; p574 : 5`-CCATGAGGT AGCTAAGGATAATAAT-3` ; p385 : 5`-CATTTTTCCTGAGTCTGGAAAAA G-3` ; p175 : 5`-GC TTCCCGCAGTTTTTTA-3` , 與 antisense primer 序列 5`-GTTGCTTGTCTGGGCAAATCCACT-3`。取 pGL-3 載體 DNA 與各部分 XPC promoter 片段的 TA 質體，利用 *KpnI* 與 *BagIII* 兩種限制酵素限制酵素反應，再進行 DNA 純化 (GeneClean III kit)，取 1  $\mu\text{l}$  的純化產物，以 1% agarose gel 電泳分析確認 DNA 的濃度。pGL-3 載體與各部分 XPC promoter 片段進行質體接合反應，之後做轉型作用，取菌塗抹至含有 Ampicillin 的 LB 培養基。待菌長出，任意挑菌以限制酵素 *KpnI* 與 *BagIII* 確認接入質體的正确性。

##### 4.8.2 細胞過渡性轉染 (Transient transfection)

以 H1299 細胞株，利用 DOTAP transfection reagent 進行 Transient transfection。48 小時後，用 1X PBS 清洗 2 次，加入 150  $\mu$ l reporter lysis buffer，混合均勻後置於  $-80^{\circ}\text{C}$  15 分鐘，再將細胞拿出於冰上回溫溶解，此步驟重複 2 次後，在顯微鏡下觀察細胞有無破裂或脫落，用 pipette 沖下細胞並裝於 1.5 ml 離心管中，置於  $-80^{\circ}\text{C}$  15 分鐘，再將細胞拿出於冰上回溫溶解，以 13,000 rpm  $4^{\circ}\text{C}$  離心 30 分鐘，取上清液。

#### 4.8.3 $\beta$ -galactosidase reporter gene assay

取 20  $\mu$ l 細胞萃取物，加入 30  $\mu$ l 滅菌二次水，再加入 2X assay buffer 【200 mM sodium phosphate, pH 7.3, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1.33 mg/ml ONPG】總體積為 100  $\mu$ l，放入  $37^{\circ}\text{C}$  下作用 30 分鐘（直到溶液有黃色生成），加入 400  $\mu$ l 1 M sodium carbonate 停止反應。取 20  $\mu$ l 細胞萃取物放入 96 well 孔盤，利用冷光測定儀加入 80  $\mu$ l luciferase assay substrate，並使用分光光譜分析儀於 420 nm 波長下測其吸光值。

### 4.9 DNA 修補基因之甲基化 (DNA methylation) 分析

#### 4.9.1 甲基化定序分析

利用 PCR 方法分析 XPC 促進子 (promoter region) 上 CpG 發生甲基化 (Hypermethylation) 的情形。取肺癌細胞株之 DNA 經 sodium bisulfate 處理並以 Wizard DNA clean up kit 純化後，進行 PCR 反應，所用 primer 序列如下：sense primer：GTTTTTYGTAGTTTTTTAGTGG；anti-sense：CCTCCTCCTCCT CCTCAC。PCR 反應步驟：denaturing  $94^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，annealing  $58^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，elongation  $72^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，此循環重複 35 次，最後以  $72^{\circ}\text{C}$  反應 10 分鐘。PCR 產物大小為 278 bp，以 2% agarose gel 電泳分析確認。PCR 產物經純化回收進行 DNA 定序分析，以確定 XPC 基因發生甲基化的位置。

#### 4.9.2 HpaII-based PCR

首先以第一次 PCR 反應確定 XPC 基因是否存在，若 XPC 基因存在則會產生 175 bp 大小片段。再取 200 ng DNA、1  $\mu$ l Hpa II 限制酵素 (restriction enzyme) 與 1  $\mu$ l 10X 限制酵素反應 buffer 於  $37^{\circ}\text{C}$  反應 16 小時後，取切割所得之產物 1  $\mu$ l，做第二次 PCR 反應。取 PCR 產物 10  $\mu$ l 以 2% agarose gel 進行電泳分析，並以 ethidium bromide 染色。採用的 primer 序列如下：XPC promoter sense primer：5'-TAGGGTGGAGTCTCCATGGTGA-3'，antisense primer：5'-TGAGCCCTTATCCAGCCCGAGC-3'。PCR 反應步驟：denaturing  $94^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，annealing  $58^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，elongation  $72^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，此循環重複 35 次，最後以  $72^{\circ}\text{C}$  反應 10 分鐘。

#### 4.9.3 Methylation specific PCR (MSP)

設計 methylation specific primer 進行 PCR。所採用的 primer 序列如下：XPC-MSP-F：5'-AACGAAGGGGCGTGGTTAAGCG-3'，XPC-MSP-R：5'-TAAACAAATTCCGCTTCCCGAATA-3'；XPC-USP-F：5'-AATGAAGGGGTGTGGTTAAGTG-3'，XPC-USP-R：5'-TAAACAAATTCCACTTCCCAAATA-3'。PCR 反應步驟：denaturing  $94^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，annealing  $60^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，elongation  $72^{\circ}\text{C}$  1 分鐘，此循環重複 35 次，最後以  $72^{\circ}\text{C}$  反應 10 分鐘。

### 4.10 染色質體免疫沉澱分析 (chromatin immunoprecipitation, CHIP)

#### 4.10.1 固定細胞內蛋白及染色質

將 formaldehyde 直接加入含細胞的細胞培養液中最終濃度為 1%，於室溫作用 15 至 20 分鐘，此時細胞內結合的蛋白及染色質會被固定。之後加入 Glycine 至最終濃度 0.125 M 停止反應，於室溫作用 10 分鐘。去除培養液後，以 cold PBS 清洗細胞 2 次，刮下細

胞，以 13,000 rpm 於 4°C 離心 5 分鐘收集細胞。

#### 4.10.2 以抗體沈降蛋白-染色質聚合物

將細胞均勻分散於 1 ml lysis Buffer ( $1 \times 10^6$  個細胞 / 200  $\mu$ l)，靜置於冰上 10 分鐘。之後，利用超音波震盪器 (sonicator) 將細胞震碎到約 300 至 500 bp 左右。再以 13,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，將上清液移去。將 sonicator 之樣品加入 protein A agarose 於 4°C 旋轉反應 1~2 小時，進行 pre-clean，再以 8,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘去除 beads。依照實驗需求，將細胞等分為數管，事先取少許細胞作為 input。本實驗分為 input、不使用抗體、分別使用 SP1、c-Fos 與 c-Jun 抗體 (Santa Cruze) 共 5 組，除 input 外其他各組使用相同量細胞，加入適量抗體置於 4°C 冰箱旋轉反應 overnight，隔天加入 50  $\mu$ l protein A agarose 反應 1~2 小時，再以 8,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘收集 Ab/protein/DNA complex。

#### 4.10.3 Protein A agarose/Ab/protein/DNA complex wash 與 elution

分別清洗緩衝液，以旋轉清洗方式清洗 10 分鐘，再以 8,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘收集 Protein A agarose/Ab/protein/DNA complex。清洗緩衝液如下：

- Low salt immune complex wash buffer【0.1% SDS, 1% Triton X-100, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)】：4°C，清洗 1 次。
- High salt immune complex wash buffer【0.1% SDS, 1% Triton X-100, 3 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)】：4°C，清洗 1 次。
- LiCl immune complex wash buffer【0.25 M LiCl, 1% Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)】：4°C，清洗 1 次。
- TE buffer【10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA】：室溫，清洗 2 次。
- Elution：去除 TE buffer 之後，加入新鮮配置之 elution buffer【0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS】150  $\mu$ l，混合均勻後於室溫下旋轉反應 15 分鐘，13,000 rpm 離心 10 分鐘後取含有 DNA/protein complex 之上清液，並且重複 1 次此 elution 之步驟。

#### 4.10.4 萃取蛋白-染色質聚合物中的 DNA 與 PCR 反應

在 input 管中也加入 Elution buffer 至 300  $\mu$ l，並加入 12  $\mu$ l 5M NaCl，放置於 65°C 過夜。之後，加入 8  $\mu$ l 0.5M EDTA、16  $\mu$ l 1M Tris pH6.5 以及 2  $\mu$ l 20  $\mu$ g/ $\mu$ l proteinase K 溶液，放置於 65°C 反應 2 小時，將蛋白分解。利用 phenol/chloroform 萃取以及酒精沉澱方法純化 DNA，並以 70% 酒精清洗 1 次，然後加入 ddH<sub>2</sub>O 溶解。設計 primer 並以 PCR 偵測欲觀察的蛋白可否結合在預測的 DNA 片段上。所用 primer 序列如下：XPC sense primer：5'-TAGGGTGGAGTCTCCATGGTGA-3'，antisense primer：5'-TGAGCCCTTATCCAGCCCGAGC-3'。PCR 反應步驟：denaturing 94°C 1 分鐘，annealing 58°C 1 分鐘，elongation 72°C 1 分鐘，此循環重複 35 次，最後以 72°C 反應 10 分鐘。

### 4.11 XPC 抗體製作

#### 4.11.1 pET32a-XPC 質體的構築

以 A549 細胞 cDNA 作為模板，加入 Pro-Taq 10X buffer 5  $\mu$ l，10 mM dNTP 2  $\mu$ l，Pro-Taq 1  $\mu$ l 及 primer 含 BamHI 限制酵素切位 (其序列如下：CGGGATCCTATCAGCCCCCAGTGGC)，及 primer 含 XhoI 限制酵素切位 (其序列如下：CCGCTCGAGACAGCTTCTCAAATGG)，最後加滅菌水到最終體積 50  $\mu$ l，並在 PCR 儀器中進行下列反應：先加熱 95°C 5 分鐘，95°C 1 分鐘，54°C 1 分鐘，72°C 1 分鐘，重複 35 循環後，72°C 10 分鐘，最後停留在 4°C。作用完畢取 10  $\mu$ l 以 1.5% agarose gel 進行電泳分析。並由 agarose gel 中回收 DNA 片段 (DNA Elution)，與 TA 載體進行接合並

進行轉形作用，最後抽取質體做定序分析。取 pET32a 載體 DNA 與 TA 載體分別利用 BamHI 與 XhoI (TAKARA) 兩種限制酵素做限制酵素反應，經 DNA 純化 (GeneClean III kit)，並將兩者進行接合反應，之後做轉型作用，取菌塗抹至含有 Ampicillin 的 LB 培養基。待菌長出，任意挑菌以限制酵素 BamI 與 XhoI 確認接入質體的正確性。將正確的質體進行另一轉形作用，將質體送入 BL<sub>21</sub>DE<sub>3</sub> 大腸桿菌中以表現融合蛋白。

#### 4.11.2 在大腸桿菌中表現融合蛋白

於前一天製備 flask 菌液 (20 ml LB / 20 µl Ampicillin)，作為大量表現菌液的菌種，隔日先測菌液濃度，以波長 600 nm 測其 OD 值，將菌液稀釋至 OD<sub>600</sub>=0.01 (500 ml LB / 500 µl Ampicillin)，於 37°C 培養直到 OD<sub>600</sub>=0.4 後，加入 100 mM IPTG (使其最終濃度為 0.5 mM) 繼續培養 4 小時，進行 induction。將菌液離心，去除上清液，以高壓破菌法取得蛋白質。

#### 4.11.3 蛋白質純化

樹脂 (HisLink<sup>TM</sup> Protein Purification Resin) (Promega) 以 stirred bar 混合均勻以及將其中的空氣打出，取一 column (Fisher) 加入適當的 resin，靜置數分鐘待液體留淨，取蛋白質通入 column，靜置數分鐘待液體留淨，加入 wash buffer【1M Tris-HCl、PH=8.0，10 mM imidazol、0.3 M NaCl】，wash 時所滴下的液體分別以 1 ml 收集，並測其 OD 值，當 OD<sub>280</sub>=0.01 以下即可，加入 elute buffer【1M Tris-HCl、PH=8.0，500 mM imidazol、0.3 M NaCl】，elute 時所滴下的液體分別以 1 ml 收集。將 elute 下來的蛋白經 SDS-PAGE gel 電泳並以 coomassie blue 染色確認 (大小約 42kDa)。

#### 4.11.4 XPC 抗原的製備

取已純化的 XPC 與滅菌的 PBS 調整濃度至 1 mg / ml，取 0.5 ml 與 Freund's adjuvant complete 0.5 ml 在三通閥中反覆壓縮使樣品與 adjuvant 能完全混合以達到乳化效果。

#### 4.11.5 注射抗原

6~8 週 BAL B/C 母鼠第一次注射以皮下注射方式施打混合均勻的抗原，因 antigen 不易吸收所以施打處會有凸起現象。之後每隔一星期以腹腔注射施打共 4 次，並抽取老鼠血液以 ELISA 方法進行抗體專一性程度分析。

### 4.12 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry (IHC))

將石臘包埋後的組織以 5 µm 的厚度加以切片，並進行免疫組織染色。先以 xylene 進行脫臘，再以 100%、95%、85%、75% 等不同濃度的酒精覆水，利用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 於室溫反應 30 分鐘以阻斷內生性過氧化酵素後，將玻片放入 0.01M citrate buffer 中以微波加熱 5 分鐘，於室溫冷卻至 citrate buffer 恢復澄清，再放入 PBS 恢復 PH 值。以一次抗體在室溫反應 2 小時後，以 PBS 洗 3 次每次 5 分鐘，再以 LSAB Kit (DAKO, LSAB 2 Kit peroxidase) 連結呈色劑 DAB 加以呈色，並以 hematoxyline 進行背景染色後，將切片以 100%、95%、85%、75% 等不同濃度的酒精脫水。再以 xylene 將酒精置換出來後，封片並進行判讀。判讀以 <10% 細胞表現的情形視為負反應；10% 以上細胞表現的情形視為正反應。

#### 4.13 XPC-RNA 干擾載體的構築

##### 4.13.1 將 XPC-RNA 干擾片段接合至 pcDNA3.1 / Myc-HisA(-) / HU6 的質體上

##### 4.13.1.1 限制酶反應 (Restriction Enzyme digestion) 和質體 (vector) 的處理

將 pcDNA3.1 / Myc-HisA(-) pcDNA 上之 CMV (CytoMegalovirus) promoter 去除，並置換 Human U6 promoter (以下稱為 pcDNA / HU6)，將此 pcDNA / HU6 質體取 20 µg，加入 5 µl 的 10X buffer 及 5 µl 的 HindIII (TAKARA) 酵素，補水到 50 µl，混合均勻於 37°C 下

作用 12~18 小時。隔天，利用 0.8% agarose gel (含 EtBr) 進行電泳分析，再以長波紫外燈確定直鏈形載體 DNA 片段位於膠體的位置，以乾淨的切膠刀片切下含有所要之 DNA 的膠體，於 1.5 ml 離心管中，再利用 GeneClean III kit 回收 DNA 片段，溶於 20  $\mu$ l 二次水，加入 *Bam*HI (TAKARA) 酵素，補水到 50  $\mu$ l，混合均勻於 37°C 下作用 12~18 小時，再利用 GeneClean III kit 回收 DNA 片段。最後取 1  $\mu$ l 使用分光光譜分析儀測定其濃度，做為接合反應濃度的依據。最後將此 pcDNA / HU6 / *Bam*HI / *Hind*III 純化載體儲存備用。

#### 4.13.1.2 Insert RNA 干擾引子的處理

XPC RNA 干擾 target 位置在 889~909 (GCTCGAGATGATGAGGAA TTG)，設計兩條互補之 RNA 干擾引子，並分別於序列的 5' 端及 3' 端增加 *Bam*HI 與 *Hind*III 切位序列，此兩條 forward 和 reverse (400  $\mu$ M) 引子各取 1  $\mu$ l，加入 100 mM ATP、T4 polynucleotide kinase 與 10X kinase buffer，最後補水至 10  $\mu$ l。於 37°C 作用 30 分鐘讓 forward 和 reverse 引子相互黏合，最後停留在 4°C。

#### 4.13.1.3 接合反應 (Ligation)

取 pcDNA / HU6 / *Bam*HI / *Hind*III 純化載體 1  $\mu$ l 及已黏合之 Insert RNA 干擾引子先取 1  $\mu$ l 經 50 倍稀釋後取出 7  $\mu$ l，和 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (New England Biolabs)，以及 1  $\mu$ l 10X T4 DNA Ligase buffer 共 10  $\mu$ l 均勻混合後，於 25°C 下進行接合反應 30 分鐘後進行轉形作用。

#### 4.13.1.4 轉形作用 (Transformation)

取一經由化學法製成的勝任菌體 (Competent bacterial cells) 150  $\mu$ l 置於冰上回溫，當稍微解凍至 1/3 時，立即加入 10  $\mu$ l ligation mixture，輕輕注入混合後，置於冰浴 30 分鐘，在 42°C 加熱 (heat shock) 1 分鐘，目的使其進行熱休克效應 (Heat shock) 並立即放在冰上，加入 500  $\mu$ l 的 LB 培養液，並在 37°C 培養箱中以 100 rpm 震盪 1 小時後，將菌液均勻塗抹在培養基上(含 ampicillin 50  $\mu$ g /  $\mu$ l)，並將培養皿移至 37°C 生長 12~16 小時，隔天觀察使是否有白色 colony 生成。

#### 4.13.1.5 菌落聚合酵素連鎖反應(Colony PCR)

為了確認有無 DNA 片段插入質體內，進一步利用 PCR 分析白色的菌落。電泳凝膠分析後，取有正確接合 pcDNA / HU6 / RNAi-XPC 的菌落培養於 5 ml broth 培養液，抽取其質體備用。

#### 4.13.1.6 質體 DNA 的抽取

本實驗使用 PlasPrep KD-01 Kit 將質體 DNA 從菌中分離。並使用分光光譜分析儀於 260 / 280 nm 波長下測定 DNA 濃度，所得的質體 DNA 溶液儲存於 -20°C 備用。並做序列分析確定序列正確與否。

#### 4.13.2 細胞轉染作用(Transfection)

以 real-time RT-PCR 方法篩選出 XPC 表現量高的細胞株 (A549 與 CL-1-0)，利用 DOTAP transfection reagent (Promega) 進行轉染作用。種  $3 \times 10^5$  個細胞於 6 公分的培養皿，於 37°C 培養箱中培養隔夜後進行轉染作用。首先配製轉染作用所需的試劑。在標示 A 的 1.5 ml 離心管中加入 3  $\mu$ g 的質體 DNA 到 25  $\mu$ l 的 serum-free basal medium 中，混合均勻備用。另外在標示 B 的 1.5 ml 離心管中將 5  $\mu$ l 的 DOTAP 試劑加到 25  $\mu$ l 的 serum-free basal medium 中，混合均勻備用。接著將 A 與 B 離心管中的試劑輕輕混合均勻，並於室溫作用 30 分鐘。30 分鐘後，以 1X PBS 清洗培養皿 2 次後，將培養皿中所有培養液抽出。之後加入 500  $\mu$ l 的 serum-free basal medium 到 AB 的混合試劑中，輕輕



混和數下後加入培養皿中。最後將其置於 37°C 培養箱培養 2 個小時，之後再加入 500 µl 含有血清的培養液。

#### 4.13.3 經由 G418 篩選穩定細胞株 (stable colony)

在進行 stable colony 篩選前，必須對 transfection 所使用的細胞株加以測試，藉以找到適宜的濃度。將 transfect (pcDNA / HU6 / RNAi-XPC) 24 小時後的細胞 (6 公分培養皿) 利用 1X TE 將細胞打下，種到 10 公分培養皿，隔日加入含有 G418 (Promega) 的培養液 (A549 與 CL-1-0 細胞所使用之 G418 濃度分別為 700 與 500 µg/ml)。約 2 至 3 天更換一次含有 G418 的培養液，持續到第 3 週肉眼可明顯的觀察到一顆顆獨立的細胞群落，每個群落約 300~500 個細胞。

#### 4.13.4 穩定細胞株 (stable colony) 的挑取與培養

將前述含有 stable colony 的 10 公分培養皿，將舊的培養液吸掉並使用 1X PBS 10 ml 清洗 2 次，加入 10 ml 不含 G418 的培養皿 2 小時，吸掉培養液並使用 1X PBS 清洗 2 次，但第 2 次不吸掉，使用 200 µl 的 tip 去吸取單一的細胞群落，吸取起時連同 50 µl 的 1X PBS 吸入至 tip 中。將含有細胞群落及 50 µl 1X PBS 排入至 48 well 培養皿，並加入 1X TE 50 µl，利用 pipette 將細胞群衝散後再加入 800 µl 的培養液。隔日，細胞已貼附於培養皿，將舊的培養液吸掉，再加入 500 µl 的培養液。

#### 4.13.5 細胞染色體 DNA 的萃取

方法同 4.5 肺組織 DNA 的萃取。

#### 4.13.6 利用 Western blot 方法挑出 XPC 蛋白表現量低的細胞株。

方法同 4.14 敘述。

### 4.14 Western blot 方法

#### 4.14.1 總蛋白質之製備

將細胞加入適量新鮮配置的消化緩衝溶液【1% SDS、100 mM Tris-HCl, pH=8.0】在 95 °C 反應 30 分鐘，以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，收取上清液即為總蛋白質。待蛋白質樣品定量完畢，即可加入等體積之 2 倍樣品緩衝溶液 (含 125 mM Tris、4% SDS、25% glycerol 和 4 mM EDTA pH 6.8) 及佔 1/20 總體積的 2-mercaptoethanol，再以 1 倍樣品緩衝溶液補體積，最後置於 dyr bath 中加熱 94°C 反應 10 分鐘使蛋白質變性。

#### 4.14.2 SDS-PAGE 的製備

本實驗選用 Hoefer 之器材製備 SDS-PAGE，其步驟如下：首先製備 15% 的下膠【二次水 2.65 ml、1.5 M Tris pH 8.8 2.5 ml、40% acrylamide-bis acrylamide (Bio-Rad) 3.75 ml、10% SDS 0.1 ml、1% ammonium persulfate (APS) (Bio-Rad) 1 ml、TEMED (Bio-Rad) 20 µl】，再製備 5% 的上膠【二次水 2.95 ml、0.5 M Tris pH 6.8 0.63 ml、40% acrylamide-bis acrylamide 0.83 ml、10% SDS 0.05 ml、1% ammonium persulfate (APS) 0.5 ml、TEMED 20 µl】。

#### 4.14.3 SDS-PAGE 之電泳操作與轉漬

膠製備好後，每個 well 放入 20~100 µg 的樣品，先用 70 volt 進行電泳 10 分鐘，再用 120 volt 進行電泳 80 分鐘，直到樣品接近底部即可停止。在電泳結束前 10 分鐘，準備一張大小恰當的 PVDF membrane (NEN)，先用甲醇漂洗 (約 15 秒)，再換成一次水振盪 5 分鐘。將膠卸下後，同時與 PVDF membrane 及二片濾紙，利用 Bio Rad-Mini Tans-Blot Cell 通以電流 110 volt 100 分鐘，將膠上的蛋白轉移到 PVDF membrane 上。將轉漬好的 PVDF membrane 浸在含 5% 脫脂奶粉的 1X Tween-Tris Buffered Saline (TTBS) 緩衝溶液【50 mM Tris、0.2% Tween 20、150 mM NaCl pH 7.5】中，於室溫下振盪 60 分鐘。再加入欲觀

察之蛋白的一次抗體於 4°C 作用一夜。將與一次抗體作用完之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉的 1X TTBS 緩衝溶液清洗兩次，再用 1X TTBS 緩衝溶液清洗 2 次，每次 20 分鐘以洗去未專一性結合的抗體，之後以 anti-mouse IgG-HRP conjugated 5000 倍稀釋或 anti-rabbit IgG-HRP conjugated 5000 倍稀釋之二次抗體於室溫下反應 2 小時。將處理完二次抗體之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉的 1X TTBS<sup>+</sup> 緩衝溶液【50 mM Tris、0.5% Tween 20、300 mM NaCl pH 7.5】清洗 2 次，再用 1X TTBS<sup>+</sup> 緩衝溶液清洗兩次。最後用 1X PBS 緩衝溶液【0.8% NaCl、0.002% KCl、0.14% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>】稍微洗一下，即可利用 E.C.L. 呈色劑 (NEN NEL104)，利用螢光影像分析儀 (FUJIFILM Image ReaderLas-1000) 分析定量經過抗體作用之蛋白影像。

#### 4.15 XPC 基因表現載體的構築

##### 4.15.1 將 XPC 片段接合

XPC 全長為 2823 bp，將 XPC 分成兩大片段，利用限制酵素切點進行接合。設計四條引子 Forward：TCCCCCGGGCCACCATGGCTCGGAAA (包含 *Sma*I 切點)、Reversed：TGGATCCGCAGTCAATC (包含 *Bam*I 切點)、Forward：GATTGACTGCGGATCCA (包含 *Bam*I 切點)、Reversed：ACGCGTCGACC CAGCTTCTCAAATG (包含 *Sal*I 切點)。抽取 A549 細胞株 RNA 進行反轉錄作用後，進行 RT-PCR。分別將 PCR 產物與 TA 載體進行接合反應後，確定序列正確無誤後，再將兩片段接合。

##### 4.15.2 限制酶反應 (Restriction Enzyme digestion) 和質體 (vector) 的處理

將 pCDNA 取 20 µg，加入 5 µl 的 10X buffer 及 5 µl 的 *Sma*I (TAKARA) 酵素，補水到 50 µl，混合均勻於 30°C 下作用 12~18 小時。隔天，利用 0.8% agarose gel (含 EtBr) 坐電泳分析，再以長波紫外燈確定直鏈形載體 DNA 片段位於膠體的位置，以乾淨的切膠刀片切下含有所要之 DNA 的膠體，於 1.5 ml 離心管中，再利用 GeneClean III kit 回收 DNA 片段，溶於 20 µl TE8.0，加入 *Sal*I (TAKARA) 酵素，補水到 50 µl，混合均勻於 37°C 下作用 12~18 小時，再利用 GeneClean III kit 回收 DNA 片段。最後取 1 µl 使用分光光譜分析儀測定其濃度，做為接合反應濃度的依據。最後將此 pCDNA / *Sma*I / *Sal*I 純化載體儲存備用。

##### 4.15.3 將 XPC 片段接合至 pCDNA / *Sma*I / *Sal*I 的質體上

取 7 µl 已接合的 XPC 片段，加入 1 µl pCDNA / *Sma*I / *Sal*I 的質體、1 µl T4 ligase (TAKARA) 及 1 µl 的 10X buffer 於 16°C 作用 12~18 小時。隔天進行轉形作用。

##### 4.15.4 細胞轉染作用 (Transient transfection)

CL-1-5 細胞株為 XPC 低度表現的細胞株，利用 JetPEI transfection reagent (Promega) 進行轉染作用。種  $8 \times 10^5$  個細胞於 10 公分的培養皿，於 37°C 培養箱中培養隔夜後進行轉染作用。首先配製轉染作用所需的試劑。在標示 A 的 1.5 ml 離心管中加入 5 或 10 µg 的質體 DNA 到 250 µl 的 NaCl 中，混合均勻備用。另外在標示 B 的 1.5 ml 離心管中將 10 µl 的 JetPEI transfection reagent 加到 250 µl 的 NaCl 中，混合均勻備用。接著將 B 離心管中的試劑加入 A 輕輕混合均勻，並於室溫作用 30 分鐘。30 分鐘後，以 1X PBS 清洗培養皿 2 次後，將培養皿中所有培養液抽出。之後加入 3 ml 的 serum-free basal medium 到 AB 的混合試劑中，輕輕混和數下後加入培養皿中。最後將其置於 37°C 培養箱培養 2 個小時，之後再加入 3 ml 含有血清的培養液。

##### 4.15.5 經由 G418 篩選穩定細胞株 (stable colony)

本實驗進一步挑選穩定表現 XPC 蛋白之 CL-1-5 細胞，方法如 4.13.3 所述，所使用 G418 濃度為 500 µg/ml。

#### 4.15.6 利用 Western blot 方法挑出 XPC 蛋白表現量高的細胞株

方法如 4.14 所述。

#### 4.16 細胞轉移試驗 (Boyden Chamber assay)

實驗前，所有器具以超音波震盪並以 75% 酒精消毒後，再以無菌二次水清洗，最後在無菌操作台陰乾。

##### 4.16.1 細胞轉移測試 (Migration)

在博登細胞移行器 (Boyden Chamber, 真興公司) 的 bottom chamber 每個 well 各置入 35  $\mu$ l 10% FBS 的 DMEM medium 或 10% FBS 的 RPMI medium。並由下至上依序組裝 bottom chamber、polycarbonate membranes (Neuro probe, 8  $\mu$ m pore, PVP free)、橡膠片和 up chamber，並鎖緊螺絲。上層以 0.5% FBS 的 DMEM medium 或 0.5% FBS 的 RPMI medium 懸浮細胞，並計數細胞  $1 \times 10^4$  cells / 50  $\mu$ l，每株細胞各 4 重複加到 up chamber 之後，於 37°C 培養 48 小時後，取出 polycarbonate membranes，使用預冷的 95% 甲醇於 4°C 下固定下層細胞 30 分鐘，在室溫下待乾，再將下層細胞經由 10% Giemsa stain 染色至少 30 分鐘。染色完後，用二次水稍微清洗。將 polycarbonate membranes 以 3M 膠帶固定在投影片上後，使用沾二次水的拭鏡紙輕輕擦去上層未轉移的細胞，再用顯微鏡物鏡 20 倍下拍照並計數細胞數目。

##### 4.16.2 細胞侵潤測試 (Invasion)

Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences catalog number 354234)，是萃取自含有豐富基底膜表現的 EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 老鼠癌細胞，主要成分有 laminin、collagen I、entactin、heparan sulfate proteoglycan (perlecan)、growth factors、matrix metalloproteinases (MMPs) 和其他蛋白分解酵素 (plasminogen activators)，以及許多未定義的化合物所組成。Matrix Gel 必需放在冰上退冰，將原始濃度 9.2 mg/ml 以 1X PBS 稀釋成 0.2 mg/ml，並分裝成每管 100  $\mu$ l。細胞侵入測試與細胞轉移測試的不同在於：在測試之前，Matrix Gel 先放至冰上退冰。等將博登細胞移行器的 bottom chamber 每個 well 置入 35  $\mu$ l 10% FBS 細胞培養液後，且其他器具組裝完成後，在 up chamber 注入 10  $\mu$ l 退冰的 Matrix Gel，並放置在無菌操作台中 4 小時，待其凝固。接著每株細胞各 4 重複加到 up chamber 之後，於 37°C 培養 48 小時後，取出 polycarbonate membranes，使用預冷的 95% 甲醇於 4°C 下固定下層細胞 30 分鐘，在室溫下待乾，再將下層細胞經由 10% Giemsa stain 染色至少 30 分鐘。染色完後，用二次水稍微清洗。將 polycarbonate membranes 以 3M 膠帶固定在投影片上後，使用沾二次水的拭鏡紙輕輕擦去上層未轉移的細胞，再用顯微鏡物鏡 20 倍下拍照並計數細胞數目。

#### 4.17 動物腫瘤形成實驗 (Tumorigenicity assay)

將已經構築的 XPC RNAi 與 XPC 過度表現之細胞株以  $10^7$  細胞數溶於 0.1 ml PBS 中，利用皮下注射方式打入六週裸鼠體內，當開始觀察到腫塊時，每隔 4 天觀察測量一次腫瘤形成的狀況，以測徑器測量腫瘤的長度與寬度並計算腫瘤的體積，腫瘤體積的計算公式為  $0.5 \times a \times b^2$  (a 是長度, b 是寬度)。經 6 週後以二氧化碳犧牲老鼠、拍照、切下腫瘤。

#### 4.18 動物腫瘤轉移實驗 (Experimental metastasis assay)

將已經構築的 XPC RNAi 與 XPC 過度表現之細胞株以  $10^6$  細胞數溶於 0.1 ml PBS 中，利用尾靜脈注射方式打入六週裸鼠體內，經 12 週後以二氧化碳犧牲老鼠，取出老鼠的肺臟觀察腫瘤生長的情形。

#### 4.19 統計分析

本研究統計以 SPSS 13.0 統計軟體進行分析，分析臨床因子與 XPC 基因啟動子甲基化和 XPC mRNA 之相關性分析以卡方檢定法 ( $\chi^2$ -test)。XPC mRNA 與存活率相關性以 Kaplan-Merier 分析，評估 XPC mRNA 與臨床因子對預後之相關性以 Cox-Regression 統計分析，分析 XPC mRNA 與臨床因子之相關性則以多變項邏輯式回歸方式進行。P<0.05 則視為有顯著差異。

## 5、結果

### 5.1 XPC 基因甲基化與肺癌形成

#### 5.1.1 比較 XPC mRNA 在 p53 突變與沒有突變之肺癌細胞株的表現

HCT116 大腸癌細胞株證實 XPC 啟動子具有 p53 結合位置。若 HCT116 細胞經過 UV 照射會誘發 p53 基因表現，同時會促進 XPC 基因的表現，因此推測 p53 是 XPC 基因的轉錄因子 (Adimoolam et al., 2002)。本研究比較 p53 基因發生突變和野生型之肺癌細胞株的 XPC 表現是否不同？共選用六種 p53 發生突變的肺癌細胞株：H1299 (p53 null)、Calu-1 (R280K)、H1355 (E285K)、H23 (M246I)、H441 (R158L) 與 H661 (S215I)，以及兩種 p53 野生型之肺癌細胞株：A549 和 CH27。利用 real-time RT-PCR 方法分析 XPC mRNA 的表現量，結果發現 p53 野生型之 A549 和 CH27 細胞之 XPC mRNA 之表現量，較 p53 發生突變之 Calu-1、H1355、H23、H441 和 H661 肺癌細胞以及 p53 不表現之 H1299 細胞為高 (Fig. 1A)。但令人驚訝的是，p53 發生突變之 H23、H661 和 H1299 之 XPC mRNA 還是能偵測到些微 XPC mRNA 的表現，這結果顯示除了 p53 調控外，可能還有其他的機制參與 XPC 基因的轉錄調控。由 Western blot 分析的結果顯示，所有細胞之 XPC mRNA 之表現量大致與其蛋白之表現一致，即 XPC mRNA 表現較高的 A549、CH27、H23 和 H1299 之細胞有較高的 XPC 蛋白之表現，而 XPC mRNA 表現較低的 Calu-1、H1355、H441 和 H661 等細胞之蛋白表現亦都較低 (Fig. 1B)。

#### 5.1.2 XPC 基因發生甲基化的位置

已知抑癌基因之啟動子 CpG 位置發生高度甲基化，會抑制該基因的轉錄活性，可能會參與癌症的形成 (Esteller M, 2002)。文獻搜尋的結果得知，有關 XPC 啟動子甲基化之研究至今尚未有任何的報告，因此本研究擬探討 XPC 基因之啟動子是否會發生甲基化，而調控 XPC 的轉錄活性。本研究先利用 NCBI 網站 (Nucleotide database) 搜尋人類 XPC DNA 的序列，發現 XPC 啟動子約有 10 kb 長。Adimoolam 等人 (2002) 發現 XPC 基因的轉錄起始位之前的 -2530 到 -2517 區域，具有一個 p53 結合位。過去研究結果顯示 HCT116 大腸癌細胞受到 UV 照射後，p53 蛋白會與 -2530/-2517 之 XPC 啟動子區域結合，而促進 XPC 的轉錄活性。因此本研究擬了解 XPC 啟動子的 -2536 到 -1 之區域中，那一片段之啟動序列具有較高之轉錄活性？本研究以缺失突變技術將該區域分成五個片段，以 reporter assay 方法確定 XPC 啟動子的那一個片段具有主要之轉錄活性？利用 PCR 方法得到 XPC 啟動子不同的片段 (p2536、p1174、p574、p384、p175) (Fig. 2A)，並與 luciferase reporter plasmid 接合後，送入 H1299 (p53-null) 或 H1299 (p53-wild type) 的肺癌細胞株分析不同片段啟動子的轉錄活性，結果發現 H1299-p53WT 細胞的這些片段之 luciferase 活性是 H1299-null 細胞的 2~3 倍 (data not shown)。雖然在 -2536 與 -1175 之間有一個 p53 結合位，但是當此片段剔除後，並沒有影響其轉錄活性。本實驗亦發現 p1174、p574 與 p385 等片段相對於 p2536 片段仍保有 70% 的轉錄活性 (Fig. 2B)。而靠近轉錄起始位的 p175 片段則仍具有 60% 轉錄活性。這結果顯示 p175 片段在 XPC 基因之轉錄調控上可能扮演重要之角色。

利用 EMBOSS program (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/EMBOSS/>) 分析發現 p175 啟動子序列包含有 17 個 CpG (Fig. 2C)，因此假設這些 CpG 位置若發生甲基化，可能會抑制 XPC 的轉錄活性。為證實此假設，本研究以 SssI 甲基酵素 (methylases) 處理 p175 質體後送入 H1299 細胞，結果發現 p175 受到 SssI 甲基酵素處理後，p175 片段之轉錄

活性幾乎完全消失 (Fig. 2D)。因此 -175/-1 啟動子序列發生甲基化，會顯著抑制 XPC 的轉錄活性。

### 5.1.3 肺癌細胞株之啟動子甲基化分析

由前述之 *in vitro* methylation 實驗結果得知，XPC 啟動子 -175 到 -1 的序列發生甲基化，會抑制 XPC 基因的轉錄活性。因此擬進一步分析在肺癌細胞株之 XPC 基因是否確實會發生啟動子甲基化？並了解 XPC 啟動子甲基化與該基因的 mRNA 的表現是否相關？本研究以 Sodium bisulfide 處理肺癌細胞株的 DNA 並進行 bisulfide direct sequencing，結果發現在 XPC 啟動子 -175 到 -1 之 17 CpG islands 中，在 CH27、H1299 和 H23 細胞只有 2-4 個 CpG 會發生甲基化，而 A549 細胞則沒有發生任何之甲基化 (Fig. 3A)，同時發現以上細胞的 XPC mRNA 大多表現較高 (Fig. 1A)。Calu-1、H441 與 H1355 細胞之 17 個 CpG islands 大多發生甲基化，且其 mRNA 也幾乎不表現 (Fig. 1A; Fig. 3A)。由 Fig. 3A 顯示 H661 細胞有 8 個 CpG 發生甲基化，而其 mRNA 有中等程度之表現 (Fig. 1A)。為了驗證 bisulfide direct sequencing XPC 啟動子甲基化的結果，本研究又以 MSP 方法偵測第 4、5、6、7、15、16 和 17 位置之 CpG islands，結果發現 Calu-1、H1355、H441 和 H661 細胞都有發生甲基化；而 H1299、H23、CH27 和 A549 則沒有偵測到甲基化 (Fig. 3B)。另外發現在第 10 和第 15 位置的 CpG island 有 HpaII 酵素切位 (CCGG)，因此又以 HpaII-based PCR 分析 XPC 啟動子之甲基化，結果再次證實 Calu-1、H441、H661 與 H1355 細胞確實發生甲基化 (Fig. 3B)。以上三種偵測啟動子甲基化之方法都有一致的結果。因此本研究證實有些肺癌細胞 XPC 基因表現較低，主要都是 XPC 啟動子發生甲基化所造成。

為了解 XPC 啟動子甲基化是否確實參與調控該基因的表現？本研究以去甲基化藥物 5-aza-dC 處理 XPC 發生甲基化之 Calu-1 與 H441 肺癌細胞，結果發現隨著處理濃度增加 (1 和 10  $\mu$ M)，XPC 之啟動子甲基化程度會隨之降低，同時 XPC mRNA 會表現量遞增 (Fig. 4A)。因此肺癌細胞之 XPC 啟動子發生甲基化是造成 XPC 轉錄不活化的主要機制。綜合以上結果得知 XPC 基因啟動子 -175 到 -1 的區域發生甲基化，對於 XPC 基因的轉錄調控扮演重要角色。

以 TRANSFAC 資料庫 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 分析 -175 到 -1 之間的序列，結果發現此序列含有 SP1 與 AP1 轉錄因子的可能結合位置 (putative binding sites)。因此本研究擬了解該啟動子之甲基化，是否會直接干擾此轉錄因子結合至 XPC 啟動子上。本研究同樣以去甲基化藥物 5-aza-dC 處理 XPC 發生甲基化之 Calu-1 與 H441 肺癌細胞，然後以 CHIP 方法偵測 SP1、c-Fos 與 c-Jun 蛋白與 XPC 啟動子之結合是否增強？由 Fig. 4B 得知以去甲基藥物處理後，SP1 與 XPC 啟動子之結合確實有增強之現象。已知 AP1 是由 c-Fos 與 c-Jun 兩者組合而成，同樣由 Fig. 4B 結果顯示 c-Fos 和 c-Jun 結合至 XPC 啟動子之能力並沒有改變，因此推測 SP1 較 AP1 在 XPC 之轉錄調控上，具有較重要之貢獻 (Fig. 4B)。

### 5.1.4 肺腫瘤組織中 XPC mRNA 和蛋白表現與啟動子甲基化之相關性

由細胞實驗結果得知 XPC 甲基化會抑制 XPC 基因的表現，因此本研究擬了解在肺腫瘤之 XPC 基因是否會發生甲基化以及是否會調控 XPC 的表現？本研究利用 HpaII-based PCR 方法偵測 158 位肺癌病患之 XPC 啟動子的甲基化 (Fig. 5B)，為了確定

HpaII-based PCR 偵測 XPC 啟動子甲基化是否確實？隨機選取部分病患之肺腫瘤組織進行 bisulfite direct sequencing (Fig. 5A)。由 Table 1 結果顯示，肺癌病患之 XPC 啟動子甲基化的發生率為 34% (53/158)。其中不抽菸者有 41% (39/94)，而抽菸者有 22% (14/64)，兩者具有統計上的差異 ( $P=0.010$ )。

本研究又以 RT-PCR 與 IHC 方法分析 158 位肺癌病患之 XPC mRNA 與蛋白之表現 (Fig. 5B 與 5C)，以了解 XPC 啟動子甲基化是否確實參與調控 XPC 基因的表現？由 Table 2 結果顯示 XPC mRNA 與 XPC 甲基化具有負相關性 ( $P<0.001$ )，同時發現 XPC mRNA 與其蛋白之表現呈正相關性 ( $P<0.001$ )。因此肺腫瘤組織中 XPC 啟動子甲基化會抑制 XPC 基因之轉錄活化參與肺腫瘤之形成。

### 5.1.6 肺腫瘤組織中 XPC 啟動子甲基化與 p53 基因發生突變之相關性

由上述細胞實驗得知，p53 突變的細胞株之 XPC 基因發生 XPC 基因啟動子甲基化較 p53 正常之細胞為多。本研究進一步了解肺腫瘤組織中，p53 突變是否與 XPC 基因啟動子發生甲基化有關？由 Table 3 結果顯示 XPC 蛋白不表現的肺癌病患有較高的 p53 突變發生，尤其是不抽菸者 (26/55, 47%)。又發現 p53 突變之患者之 XPC 啟動子發生甲基化的頻率 (25/59, 42%) 較 p53 正常之患者 (28/99, 28%) 為高 ( $P=0.070$ , Table 4)。

已知 O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 是一 DNA 修補基因，其啟動子會發生甲基化，且發現 MGMT 啟動子甲基化與 p53 發生 G→T 之突變形式具有相關性 (Esteller et al., 2002, Wolf et al., 2001, Zhang et al., 2003)。由 Table 1 的結果得知，p53 突變肺癌病患有高頻率的 XPC 甲基化，因此擬進一步了解肺癌病患之 XPC 甲基化與何種 p53 突變型式有關？結果發現 59 位具有 p53 突變，又有 XPC 甲基化的肺癌病患，其 p53 突變型式為 G→T 與 G→C 頻率均較 XPC 沒有甲基化之肺癌病患為高 (G→T, 28% vs. 9%,  $P=0.007$ ; G→C, 16% vs. 6%,  $P=0.047$ )，但是其他的 p53 突變型式則沒有統計上之差異 (Table 4)。若將兩種 G→T 與 G→C 突變型式合併來分析亦發現，p53 G→T 與 G→C 突變之患者的 XPC 甲基化頻率 (11/16, 69%) 顯著高於其他 p53 突變型式 (14/43, 33%,  $P=0.012$ , Fig. 6B) 以及 p53 正常之肺癌患者 (28/99, 28%,  $P=0.002$ ) (Fig. 6A)。

## 5.2 XPC 基因與肺癌轉移

由上述結果得知，XPC 基因啟動子會發生甲基化而抑制 XPC 基因的表現；而且 XPC 甲基化與 p53 發生 G→T 及 G→C 兩種突變型式具有相關性。過去研究報告發現，XPC 缺失的細胞 (GM16684 和 GM00671) 經過 cisplatin 藥物處理後，一些參與細胞週期的蛋白 p53 與 p21 會失去功能；細胞增生的蛋白 cyclin dependent kinases 2 (cdk2) 和 cyclin E 之表現量會增加 (Wang et al., 2004)。動物實驗亦證實 XPC 缺失的小鼠會發生肺腺瘤，若有另一個抑癌基因，例如 GADD45 發生突變，則此小鼠會產生肺腺癌 (lung adenocarcinoma)，此腫瘤會較易轉移至鄰近淋巴結 (Hollander et al., 2005)。因此本研究利用動物模式，探討 XPC 發生去活性時，是否會改變腫瘤轉移與侵襲之能力導致腫瘤更加惡化？

### 5.2.1 XPC 基因對細胞轉移與侵襲之能力的影響

本實驗選用 CL-1 系列細胞株：CL-1-0，CL-1-1，CL-1-3 和 CL-1-5，此系列細

胞是由多次的體外侵襲實驗 (*in vitro* invasion assay) 所篩選出一系列侵襲及轉移能力越來越強的肺腺癌細胞，其轉移能力依次序由低至高為 CL-1-0, CL-1-1, CL-1-3 和 CL-1-5，以了解 XPC 基因是否參與肺腫瘤轉移。本研究以 Western blot 分析 CL-1 系列細胞株 XPC 蛋白之表現，結果發現隨著轉移能力愈強，XPC 蛋白表現則愈低 (Fig. 7A)。因此推測 XPC 的表現降低可能與腫瘤之轉移能力有關。為了解 XPC 表現降低與肺腫瘤轉移和侵襲能力是否確實有關，本研究分析 XPC 剔除之 CL-1-0 細胞其轉移和侵襲能力是否增強？另外，本研究將 XPC 基因轉染於 XPC 表現較低的 CL-1-5 細胞，以觀察該細胞的轉移和侵襲能力是否下降？以上兩種策略，能了解 XPC 基因在肺腫瘤轉移與侵襲之可能角色。

本研究首先以 Boyden chamber assay 來分析細胞轉移與侵襲能力是否改變？結果發現 CL-1-0 肺癌細胞之 XPC 基因被剔除後，其腫瘤轉移與侵襲能力顯著高於 CL-1-0 載體控制組細胞 (Fig. 7C)，此外亦發現與肺轉移有關之 CRMP-1 的蛋白表現明顯降低 (Fig. 7C)。因此推測 XPC 基因表現下降可能參與癌細胞之轉移與侵襲。另一方面，構築 XPC 過度表現的載體 (pCDNA-XPC) 送入 XPC 表現較低的 CL-1-5 細胞中，觀察細胞轉移與侵襲能力是否降低？此外 XPC 過度表現的 CL-1-5 細胞，以 Western blot 偵測 XPC 蛋白是否有表現？結果發現細胞確實有 XPC 蛋白表現 (Fig. 7B)。並發現 CRMP-1 蛋白明顯回復 (Fig. 7B)。同時利用 Boyden chamber assay 分析細胞轉移與侵襲能力是否改變？結果發現細胞的轉移與侵襲能力被抑制 (Fig. 7C)。

### 5.2.2 XPC 基因對動物腫瘤形成與轉移的影響

進一步將 CL-1-0 之 XPC 基因剔除與 XPC 過度表現之 CL-1-5 細胞株經由皮下注射至裸鼠體內，以觀察 XPC 基因是否對於腫瘤形成有所影響。每種細胞株分別注射至 10 隻裸鼠體內，每隻裸鼠注射  $10^7$  細胞。CL-1-5 載體控制組在皮下注射後 13 天可觀察到有腫瘤形成，之後每 4 天觀察測量一次腫瘤的大小，而腫瘤體積計算公式為  $0.5 \times a \times b^2$  (a 為腫瘤的長度，b 是寬度)。由結果得知，注射 CL-1-5 載體控制組的老鼠腫瘤長得最快最大，接著依序為注射 CL-1-0 之 XPC 基因剔除細胞株 (第 21 天腫瘤形成)、XPC 過度表現之 CL-1-5 細胞株 (第 25 天腫瘤形成) 以及 CL-1-0 載體控制組 (Fig. 8B)。在裸鼠的腫瘤形成過程中，注射 CL-1-5 載體控制組與 CL-1-0 之 XPC 基因剔除細胞株之老鼠全部都有形成腫瘤；注射 XPC 過度表現 CL-1-5 細胞株之老鼠僅一隻形成腫瘤；CL-1-0 載體控制組則無觀察到腫瘤之形成 (Fig. 8A)。

此外將 CL-1-0 之 XPC 基因剔除與 XPC 過度表現之 CL-1-5 細胞株經由尾靜脈注射方式打入裸鼠體內，以觀察 XPC 基因是否對於腫瘤轉移之影響。每種細胞株分別注射至 10 隻裸鼠體內，每隻裸鼠注射  $10^6$  細胞。注射 CL-1-0 之 XPC 基因剔除的老鼠於 8 週有死亡的現象，其肺臟與肝臟可觀察到癌細胞的轉移；CL-1-0 載體控制組則無此結果。而注射 XPC 過度表現之 CL-1-5 細胞株的老鼠於 12 週以二氧化碳犧牲，裸鼠肺臟中並無觀察到癌細胞轉移；CL-1-5 載體控制組之老鼠其肺臟可觀察到腫瘤之形成 (Fig. 9A)。裸鼠肺腫瘤轉移的生成率，注射過度表現 XPC 之細胞株的老鼠為 0% (0/10) 低於載體控制組 50% (5/10)；而注射 XPC 剔除之細胞株的老鼠為 60% (6/10) 高於載體控制組 0% (0/10)。老鼠肺臟經過秤重後發現，相較於載體控制組，注射過度表現 XPC 的細胞株之老鼠有下降的趨勢；而注射 XPC 剔除之細胞株的老鼠則增加 (Table 5)。



### 5.2.3 肺癌患者之 XPC mRNA 的表現量與臨床因子之相關性

由上述結果得知，XPC 可能參與癌細胞之轉移與侵襲。臨床報告指出，晚期的肺癌病患之腫瘤經常發生轉移，存活率也較差 (Greenlee et al., 2001)。因此本研究利用 real-time RT-PCR 方法，分析 126 個肺癌病患之 XPC mRNA 表現量與患者之臨床因子做一相關性之統計分析，以了解 XPC mRNA 表現量在肺癌腫瘤化過程之貢獻？本實驗以 126 位肺癌患者 XPC mRNA 表現之中位值 (median value) 分為高或低表現量。由 Table 6 結果顯示，有 70% (38/54) 之抽菸患者之 XPC mRNA 為高表現，此頻率顯著高於不抽菸者 (33%，24/72， $P < 0.001$ )；第一期與第二期的早期肺癌患者有 57% (45/79) 為 XPC mRNA 高表現者，此頻率顯著高於第三期的晚期肺癌患者 (36%，17/47， $P = 0.024$ )。亦發現淋巴結轉移 N0 的患者高表現者有 57% (35/62)，此頻率同樣有高於 N1 與 N2 的肺癌患者之趨勢 (43%，27/64， $P = 0.077$ )；而復發的肺癌患者為高表現者有 33% (9/27) 低於沒有復發的肺癌患者 (53%，53/99， $P = 0.063$ )。

### 5.2.4 XPC mRNA 表現量可做為肺癌患者之臨床預後指標

首先以 Kaplan-Meier 統計法做單變項分析 XPC mRNA 表現量與肺癌患者之存活率的相關性。由 Table 7 結果顯示，XPC mRNA 高表現量的肺癌患者之存活天數 (1284 天) 與存活率 (40.32%) 顯著高於 XPC mRNA 低表現之肺癌患者 (688 天、32.81%， $P = 0.0440$ )。已知不抽菸者之腫瘤細胞組織型態大多為肺腺癌，不抽菸者之 XPC mRNA 有 33% (24/72) 為低表現者，顯著低於抽菸者之 XPC mRNA 的低表現者 (70%，38/54)。為了解 XPC mRNA 表現量是否可以做肺腺癌患者的臨床預後指標。本研究有 58 位為肺腺癌與 68 位鱗狀上皮細胞肺癌患者，以 Kaplan-Meier 方法分析之結果發現，肺腺癌患者 XPC mRNA 低表現之存活率顯著低於高表現者 (Fig. 10B， $P = 0.0076$ )，而鱗狀上皮細胞癌患者中則無此發現 (Fig. 10C， $P = 0.3498$ )。

本研究進一步了解 XPC mRNA 表現量，是否可做為肺癌患者獨立之臨床預後指標。以 Cox's regression 統計方法進行多變項分析，結果如 Table 8 所示。XPC mRNA 表現、抽菸習慣、腫瘤細胞組織型態與腫瘤期別都具有統計上之顯著意義，即 XPC mRNA 低表現者有 1.885 之相對危險性 (relative risk, RR;  $P = 0.014$ ，95% CI = 1.139 ~ 3.121)，抽菸習慣有 1.964 之相對危險性 ( $P = 0.022$ ，95% CI = 1.103 ~ 3.497)；腫瘤細胞組織型態有 1.700 之相對危險性 ( $P = 0.049$ ，95% CI = 1.002 ~ 2.886)；腫瘤期別有 1.678 之相對危險性 ( $P = 0.039$ ，95% CI = 1.028 ~ 2.739)。XPC mRNA 低表現的肺癌患者，是高表現者的 1.885 倍的危險性，此相對比值還稍高於肺癌患者之腫瘤期別，顯示 XPC mRNA 表現量適合做為肺癌患者之臨床預後指標。

## 6、討論

有關 DNA 修補基因之相關研究大多著重於的基因多形性與肺癌的相關性(De et al., 2007; Kiyohara et al., 2007; Michiels et al., 2007)。有學者以血液淋巴球分析 DNA 修補能力進行 case-control study 時發現，DNA 修補能力降低與肺癌發生有關 (Wei et al., 1996; Bosken et al., 2002)。本研究室初步的 case-control 之研究發現 Lys939Gln (A > C) 與 PAT +/- 兩種 XPC 基因多型性與台灣肺癌之發生沒有相關性。Cheng 等人 (2000) 發現參與 NER 修補作用的 XPG/ERCC5 與 CSB/ERCC6 基因之表現量較低，可能會增加肺癌發生的危險性；本研究室過去之研究結果發現，肺癌病患之 ERCC1、ERCC5 和 XPC 三種 DNA 修補基因的 mRNA 表現率皆低於非癌症者，因此推測修補基因表現降低可能部分參與肺腫瘤之形成，但何種 DNA 修補基因表現最能代表 DNA 修補能力？以及是否因而造成肺腫瘤之形成？則需進一步的探討。

過去研究得知啟動子甲基化會抑制參與 BER (base excision repair) 之 DNA 修補基因的表現，例如 MGMT 與 XRCC5 基因。在肺癌病患之腫瘤組織中 MGMT 啟動子發生甲基化會造成該基因的去活化 (Vallböhmer et al., 2006)。大腸癌病患發現 MGMT 基因會發生甲基化，而增加 p53 基因發生 G→A 的突變 (Zhang et al., 2003)。最近研究發現肺癌病患之 XRCC5 基因會發生甲基化，而抑制其蛋白之表現 (Lee et al., 2007)。另一研究發現參與 NER 的 hHR23B 基因在 IL-6 調控的骨髓瘤細胞 (KAS-6/1) 會發生甲基化 (Peng et al., 2005)。本研究則首次發現 XPC 基因在肺腫瘤化過程中，會發生甲基化而抑制 XPC 的轉錄活性。

### 6.1 XPC 基因啟動子甲基化

#### 6.1.1 XPC 基因的轉錄調控

過去研究報告指出，抽菸之主要致癌物 BaP 會誘發 DNA 修補基因的表現 (Wei et al., 2000; Shen et al., 2003)。Adimoolam 等人 (2002) 發現 HCT116 大腸癌細胞經過 UV 照射後，會誘發 p53 進而活化 XPC 基因的轉錄表現。然而本研究細胞實驗結果顯示，p53 發生突變的肺癌細胞仍可以偵測到少量的 XPC 表現 (Fig. 1A)，此結果暗示還有其他機制調控 XPC 的轉錄活性。本研究利用 p53 null 和轉染 p53 WT 之 H1299 肺癌細胞找到 -175/-1 序列，是主要調控 XPC 轉錄活性之啟動子片段 (Fig. 2B)。在 HCT116 大腸癌細胞之 -2536 與 -1175 之 XPC 啟動子序列有一個 p53 結合位置 (Adimoolam et al., 2002)，但是在 H1299 肺癌細胞，既使剔除此 p53 結合位之序列，亦不會影響其轉錄活性，因此推測不同的細胞株有不同之 XPC 調控序列。另外，本研究細胞並沒有處理 DNA 傷害之藥物，因此肺癌細胞所觀察到之結果與大腸癌細胞所得之結果有所不同。

#### 6.1.2 XPC 啟動子發生甲基化可能之分子機轉

已知野生型的 p53 會調控 DNA 甲基化轉移酵素 (DNMT1)，當 p53 失去功能時，DNMT1 會大量表現而造成抑癌基因發生甲基化 (Estève et al., 2005)。本研究擬了解是否會透過同樣的機制造成 XPC 基因發生甲基化。因此利用 RNA 干擾技術將 A549 細胞的 p53 基因剔除後，偵測 XPC mRNA 與甲基化的表現以及分析一些參與 chromatin remodeling 蛋白，例如 acetylated histone 3 (H3)、histone 4 (H4)、DNMT1 蛋白與 XPC 啟動子結合的能力。結果發現 p53 剔除之細胞的 XPC mRNA 表現量，較 A549 原來細胞低，且 XPC 啟動子會發生甲基化。而 DNMT1 與 XPC 啟動子結合能力有增加的現象；

但 acetylated H3 及 H4 與 XPC 啟動子的結合能力則會降低 (data not shown)，由上述之結果證實 p53 失去功能後，DNMT1 與 XPC 啟動子結合之能力會增加，同時會改變參與 chromatin remodeling 之蛋白與 XPC 啟動子結合的活性，造成 XPC 基因發生甲基化。這些結果可用來解釋為何 p53 發生突變的細胞會有較高頻率之 XPC 基因發生甲基化。以上作用機制，同樣在 MGMT 甲基化和 p53 突變之相關性之研究中得到證實。

### 6.1.3 XPC 啟動子發生甲基化之可能原因

本研究分析 158 個肺癌患者之 XPC 啟動子的甲基化，結果顯示肺癌患者 XPC 甲基化之發生頻率為 35%。不抽菸患者之 XPC 啟動子發生甲基化頻率約為抽菸患者的兩倍 (41 vs. 22%，Table 1)，本研究所觀察到之結果與過去研究的結果並不一致。過去研究指出抽菸會導致許多基因發生甲基化，包括 retinoic acid receptor beta-2 (RARbeta-2)、CDH13 (H-cadherin)、p16<sup>INK4a</sup> 與 RAS association domain family 1 (RASSF1A) 等 (Zöchbauer-Müller et al., 2002; 2003; Toyooka et al., 2003; Sato et al., 2007)。大多顯示抽菸肺癌患者之 p53 突變頻率都高於不抽菸患者 (Gao et al., 2003; Chang et al., 2005)。但是本研究之結果卻沒有相同之發現，而是抽菸與不抽菸者之 p53 突變頻率並沒有統計上之差異 (不抽菸者為 36% (39/94)；抽菸者為 39% (25/64)，P= 0.712)。由上述結果獲知，台灣肺癌患者在 p53 和 XPC 在肺腫瘤化之過程中，可能有不同的致病分子機轉，尤其是不抽菸者。目前仍不清楚為何在不抽菸者會有較高發生 XPC 甲基化之頻率。

由流行病學資料顯示暴露重金屬含量高的肺癌病患之 p53 有較高突變的頻率 (Harty et al., 1996; Kondo et al., 1997)。過去研究發現，A549 細胞株經過重金屬鎳處理後，會改變參與 chromatin remodeling 之相關蛋白 (H2A、H2B、H3 與 H4) 的活性造成基因啟動子發生甲基化進而抑制基因表現 (Costa et al., 2005; Ke et al., 2006)。本研究室最近之研究結果顯示，鎳含量較高之肺癌患者的 p53 基因突變與 XPC 發生甲基化之頻率都較低含量之患者為高 (data not shown)。因此推測重金屬暴露可能在台灣肺癌之致腫瘤化可能扮演部分的角色。

## 6.2 XPC 去活性的影響

本研究發現 XPC 啟動子會發生甲基化而抑制 XPC 的轉錄活性，並且進一步探討當 XPC 去活性後對於細胞有何影響？過去研究報告指出，XPC 會受到 p53 的轉錄調控之外；當 XPC 去活化其 p53 基因會發生突變 (Reis et al., 2000; Azzam et al., 2002; Inga et al., 2002; Nahari et al., 2004)。本研究建立 XPC 剔除之 p53 為野生型 (A549) 的細胞，更發現 p53 沒有發生突變就會失去功能，進而改變細胞週期並增強癌細胞之轉移與侵襲的能力。

### 6.2.1 XPC 基因對癌細胞轉移與侵襲能力的影響

本研究發現 XPC 剔除之 CL-1-0 細胞之轉移與侵襲能力會顯著增強 (Fig. 8C)，若將轉移能力較高之 CL-1-5 轉染 XPC 表現之載體，則會抑制該細胞之轉移與侵襲能力 (Fig. 8C)。已知 CTGF 會調控 CRMP-1 表現 (Chang et al., 2004)，本研究結果亦可觀察到相同結果。本研究發現在 XPC 剔除之 CL-1-0 其 CRMP-1 的蛋白表現降低，其 CTGF 蛋白表現也下降；而在 XPC 過度表現之 CL-1-5 細胞有相反的結果 (Fig. 8B)。

### 6.2.2 XPC mRNA 可做為肺癌病患之預後指標

不抽菸者的肺癌之細胞型態大多為腺癌，而此細胞型態之肺癌較不易被早期診斷發現，而患者之預後亦大多較差 (Chen et al., 2005)。因此建立不抽菸患者之臨床預後指標在臨床醫學是非常迫切的研究課題。近年來，real-time RT-PCR 廣泛應用於偵測基因之轉錄表現 (Ko et al., 2000; Müller-Tidow et al., 2005; Buttitta et al., 2005; Ferraro et al., 2005; Sher et al., 2005; Yuan et al., 2005)，以建立一些臨床應用之生物指標。本研究同樣利用 real-time RT-PCR 偵測 126 個肺癌病患之 XPC mRNA 之表現，結果發現抽菸患者 XPC mRNA 有高表現的是不抽菸者的兩倍 (70 vs. 33%， Table 6)，這個結果與過去研究報告相符。過去研究報告指出，抽菸之主要致癌物 BaP 會誘發 DNA 修補基因的表現 (Wei et al., 2000; Shen et al., 2003)；Adimoolam 等人 (2002) 發現 XPC 基因會受到 DNA 傷害藥物誘發轉錄表現。本研究以 Kaplan-Meier 統計分析發現 XPC mRNA 高表現量的肺癌患者之存活天數 (1284 天) 與存活率 (40.32%) 都顯著高於 XPC mRNA 低表現之肺癌患者 (688 天、32.81%， $P=0.0440$ ; Table 7)。若僅以 58 位肺腺癌病患來分析，不抽菸者 XPC mRNA 低表現之頻率顯著高於抽菸者 (69 vs. 8%， $P<0.001$ )；女性肺腺癌低表現之頻率有高於男性肺腺癌之趨勢 (73 vs. 47%， $P=0.057$ )。以 Cox's regression 分析發現 XPC mRNA 低表現者是高表現者的 3.604 之相對危險 ( $P=0.007$ ，95% CI = 1.414 ~ 9.188)，此相對危險稍高於以全部肺癌患者統計所得之相對危險 (RR = 1.885)。這些結果顯示 XPC mRNA 表現量適合做為肺腺癌患者之臨床預後指標。

## 7、參考文獻

- Auckley DH, Crowell RE, Heaphy ER, Stidley CA, Lechner JF, Gilliland FD, Belinsky SA. (2001) Reduced DNA-dependent protein kinase activity is associated with lung cancer. *Carcinogenesis*. 22, 723-727.
- Adimoolam S, Ford JM. (2002) p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 12985- 90.
- Bonnie KB and Michael JS (1998) Nucleosome unfolding during DNA repair in normal and xeroderma pigmentosum (group C) human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 273, 17517-17524.
- Coverley, D, Kenny, MK, Lane, DP, and Wood, RD. (1992). A role for the human single-stranded DNA binding protein HSSB/RPA in an early stage of nucleotide excision repair. *Nucl. Acids Res*. 20, 3873-3880.
- Cheng L, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. (2000) Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis*. 21, 1527-30.
- Chang JW, Chen YC, Chen CY, Chen JT, Chen SK, Wang YC. (2000) Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 6, 1639-46.
- Chang CC, Shih JY, Jeng YM, Su JL, Lin BZ, Chen ST, Chau YP, Yang PC, Kuo ML. (2004) Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 96, 364-75.
- Choudhury A, Charo J, Parapuram SK, Hunt RC, Hunt DM, Seliger B, Kiessling R. (2004) Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. *Int J Cancer*. 108, 71-7.
- Devesa SS, Blot WJ, and Fraumeni JF. (1989) Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. *J. Nat. Cancer Inst*. 81, 1568-71.
- Deng J. (1985) 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, 271-4.
- Friedberg EC, David L Cheo, Dennis K. Burns, Lisiane B. Meira and Jean Francois Houle (1999) Mutational Inactivation of the Xeroderma pigmentosum group C gene confers predisposition to 2-acetylaminofluorene-induced liver and lung cancer and to spontaneous testicular cancer in *Trp53<sup>-/-</sup>* mice. *Cancer Res*. 59, 771-775.
- Gao YT, Blot WJ, Zheng W, Ershow AG, Hsu CW, Levin LI, Zhang R, and Fraumeni Jr JF. (1987) Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer*. 40, 604-609.
- Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F, Ono Y, Uematsu K, Takeda Y, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S. (2001) Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer*. 37, 1554-61.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. (2001) Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*. 51, 15-36.
- Gao WM, Mady HH, Yu GY, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF, Keohavong P. (2003) Comparison of p53 mutations between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the

- lung: unique spectra involving G to A transitions and G to T transversions in both histologic types. *Lung Cancer*. 40, 141-50.
- Hou JW. (2002) Human DNA repair defects: are they predisposing to cancer? *Acta Paediatr Taiwan*. 43, 4-5.
- Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, Moriuchi T, Katoh H, Nishimura M, Dosaka-Akita H. (2002) Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer*. 94, 752-8.
- Hu JJ, Hall MC, Grossman L, Hedayati M, McCullough DL, Lohman K, Case LD. (2004) Deficient nucleotide excision repair capacity enhances human prostate cancer risk. *Cancer Res*. 64, 1197-201.
- Koo LC, and Cho JH. (1990) Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers. *Int J Epidemiol*. 19, S14-S23.
- Kung IT, So KF, Lam TH. (1984) Lung cancer in Hong Kong Chinese: mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer*. 50, 381-8.
- Kawasaki H, Taira K. (2003) Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res*. 31, 700-7.
- Kalluri R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 3, 422-33.
- Lobe LA, Emster VL, Warner KE, Abbotts J, and Laszlo J. (1984) Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*. 44, 5940-5958.
- Li L, Bales ES, Peterson CA, and Legerski, RJ. (1993) Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group C. *Nature Genet*. 5, 413-417.
- Li D, Firozi PF, Wang LE, Bosken CH, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. (2001) Sensitivity to DNA damage induced by benzo(a)pyrene diol epoxide and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Cancer Res*. 61, 1445-1450.
- Lee YC, Wu CT, Chen CS, Hsu HH, Chang YL. (2002) The significance of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin expression in surgically treated non-small cell lung cancers of 3 cm or less in size. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 123, 502-7.
- MacLennan R, da Costa J, Day NE, Law CH, Ng YK, and Shanmugaratnam K. Risk factors for lung cancer in Singapore Chinese, a popula. Mu D, Hsu DS and Sancar A. (1996) Reaction mechanism of human DNA-repair excision nuclease. *J. Biol. Chem*. 271, 7177-7186.
- Mu D, Hsu DS and Sancar A. (1996) Reaction mechanism of human DNA-repair excision nuclease. *J. Biol. Chem*. 271, 7177-7186.
- Mitsuo W and Aziz S (1998) Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6669-6674.
- Marito A, Chikahide M, Mitsuyo T, Akio U, Kaoru S, Jun K, Yoshiaki O and Fumio H. (2001) Centrosome protein centrin 2 / caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 18665-18672.
- Martinez LA, Naguibneva I, Lehrmann H, Vervisch A, Tchenio T, Lozano G, Harel-Bellan A.

- (2002) Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 14849-54.
- Murakawa K, Tada M, Takada M, Tamoto E, Shindoh G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Kawakami A, Fujiwara Y, Kobayashi N, Shirata K, Nishimura N, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Katoh H, Yoshiki T, Moriuchi T. (2004) Prediction of lymph node metastasis and perineural invasion of biliary tract cancer by selected features from cDNA array data. *J Surg Res.* 122, 184-94.
- Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. (2003) Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* 545, 144-50.
- Pignatelli M. (1998) Integrins, cadherins, and catenins: molecular cross-talk in cancer cells. *J Pathol.* 186, 1-2.
- Rudiger HW, Schwartz U, Serrand E, Stief M, Krause T, Nowak D, Doerjter G and Lehnert G. (1989) Reduced O<sup>6</sup>-methylguanine repair in fibroblast cultures from patients with lung cancer. *Cancer Res.* 5623-5626.
- Reis AM, Cheo DL, Meira LB, Greenblatt MS, Bond JP, Nahari D, Friedberg EC. (2000) Genotype-specific Trp53 mutational analysis in ultraviolet B radiation-induced skin cancers in Xpc and Xpc Trp53 mutant mice. *Cancer Res.* 60, 1571-9.
- Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Risch A, Rittgen W, Kayser KW, Dienemann H, Schulz V, Drings P, Thiel S, Bartsch H. (2001) Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 95, 86-91.
- Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, Bennett J, Tolentino MJ. (2003) Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis.* 30, 210-6.
- Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, Chambon P and Egly JM. (1993) DNA repair helicase: A component of BTF2(TF II H) basic transcription factor. *Science.* 260, 58-63.
- Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JHJ, and Egly JM. (1994) The ERCC2/DNA repair protein is associated with the calss- II BTF2/TF II H transcription factor. *EMBO J.* 13, 2388-2392.
- Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, et al (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2, 223-232.
- Shen H, Sturgis EM, Khan SG, Qiao Y, Shahlavi T, Eicher SA, Xu Y, Wang X, Strom SS, Spitz MR, Kraemer KH, Wei Q. (2001) An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene XPC and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Res.* 61, 3321-5.
- Shih JY, Yang SC, Hong TM, Yuan A, Chen JJ, Yu CJ, Chang YL, Lee YC, Peck K, Wu CW, Yang PC. (2001) Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 93, 1392-400.
- Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. (2003) Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood.* 101, 1566-9.
- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. (2003) RNA

- interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 9:347-51.
- Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, Wijkstrom H, Larsson P, Kumar R, Hemminki K. (2004) Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis.* 25, 729-34.
- Tay SC, Tsai SF, Lee SS. (1988) Lung cancer in Taiwan. *Natl Public Health Assoc (ROC).* 8, 189-201.
- Takenaka K, Shibuya M, Takeda Y, Hibino S, Gemma A, Ono Y, Kudoh S. (2000) Altered expression and function of beta1 integrins in a highly metastatic human lung adenocarcinoma cell line. *Int J Oncol.* 17, 1187-94.
- Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. (2002) DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene.* 21, 5450-61.
- Wei, Q., Eicher SA, Guan Y, Cheng L, Xu J, Young LN, Saunder KC, Jiang H, Hong WK, Spitz MR and Strom SS. (1998) Reduced expression of hMLH 1 and hGTBP /hMSH 6: a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. & Prev.* 7, 309-314.
- Wu M, Kelley MR, Hansen WK, Martin WJ. (2001) Reduction of BCNU toxicity to lung cells by high-level expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase. *Am J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, 755-761.
- Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW, Chen JT, Shih CM, Chen CY. (2003) Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest.* 111, 887-95.
- Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD, Koberle B. (2004) Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int. J Cancer.* 110, 352-61.
- Zhang L, Lu W, Miao X, Xing D, Tan W, Lin D. (2003) Inactivation of DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relation to p53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 24,1039-44.

本計畫相關之著作

- 吳怡慧 (2001) “核苷酸修補基因之表現與肺癌形成之相關研究” 中山醫學大學毒理學研究所碩士論文
- Wu YH, Tsai Chang JH, Cheng YW, Wu TC, Chen CY, Lee H. (2007) Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *Oncogene*, 26, 4761-73.
- Wu YH, Cheng YW, Chang JT, Wu TC, Chen CY, Lee H. (2007) Reduced XPC messenger RNA level may predict a poor outcome of patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 110, 215-23.
- 吳怡慧 (2007) “啟動子甲基化造成 XPC 去活化在肺腫瘤化之角色” 中山醫學大學醫學分子毒理學研究所博士論文



## 8、表與圖

Table 1. Relationships between XPC promoter methylation and clinical characteristics in NSCLC patients.

Characteristics	Patients No.	XPC methylation		P
		Negative (%)	Positive (%)	
<b>Age (years)</b>				
≤65	77	51 (66)	26 (34)	0.954
>65	81	54 (67)	27 (33)	
<b>Gender</b>				
Female	45	32 (71)	13 (29)	0.434
Male	113	73 (65)	40 (35)	
<b>Smoking</b>				
Non-smoker	94	55 (59)	39 (41)	0.010
Smoker	64	50 (78)	14 (22)	
<b>Tumor stage</b>				
1	58	37 (64)	21 (36)	0.334
2	38	29 (76)	9 (24)	
3	62	39 (63)	23 (37)	
<b>Tumor type</b>				
AD	82	54 (66)	28 (34)	0.868
SQ	76	51 (67)	25 (33)	
<b>T value</b>				
1	7	4 (57)	3 (43)	0.392
2	112	71 (63)	41 (37)	
3	33	26 (79)	7 (21)	
4	6	4 (67)	2 (33)	
<b>N value</b>				
0	73	49 (67)	24 (33)	0.649
1	36	25 (69)	11 (31)	
2	47	29 (61)	18 (39)	
3	2	2 (100)	0 (0)	
<b>p53 mutation</b>				
Negative	99	71 (72)	28 (28)	0.070
Positive	59	34 (58)	25 (42)	

Table 2. The association of XPC mRNA expression with its promoter methylation and protein expressions in lung cancer patients.

<b>Parameter</b>	<b>XPC mRNA expression</b>			<b>P</b>
	<b>No.</b>	<b>Negative (%)</b>	<b>Positive (%)</b>	
<b>XPC promoter methylation</b>				
Negative	105	51 (49)	54 (51)	<0.001
Positive	53	45 (85)	8 (15)	
<b>XPC protein</b>				
Negative	86	67 (78)	19 (22)	<0.001
Positive	69	26 (38)	43 (62)	

Table 3. The association of XPC protein expression with p53 mutation in smoker and nonsmoker with lung cancer.

XPC protein	p53 mutation		P
	Negative	Positive	
<b>Nonsmoker</b>			
Negative	55	29 (53)	0.010
Positive	38	30 (78)	
<b>Smoker</b>			
Negative	31	19 (61)	0.793
Positive	31	20 (64)	

Table 4. Comparison of p53 mutation patterns between lung cancer patients with and without XPC promoter methylation.

p53 mutation pattern	XPC status	
	Unmethylated (%)	Methylated (%)
<b>All sites</b>		
A:T>G:C	6 (17)	6 (24)
G:C>A:T	8 (24)	3 (12)
A:T>T:A	5 (15)	1 (4)
A:T>C:G	3 (9)	2 (8)
G:C>T:A	3 (9)	7 (28) <sup>a</sup>
G:C>C:G	2 (6)	4 (16) <sup>b</sup>
Frame shift	7 (20)	2 (8)
Total	34	25
<b>CpG sites</b>		
G:C>A:T	4 (50)	0
G:C>T:A	1 (33)	1 (14)
G:C>C:G	0	3 (75)

Lung cancer patients with p53 mutations were enrolled for this analysis. Frame shifts are insertions or deletions of  $\geq 1$ bps.

<sup>a</sup>P = 0.007 versus unmethylated tumors.

<sup>b</sup>P = 0.047 versus unmethylated tumors.

Table 5. Regulation of lung metastasis in the nude mice model by the XPC.

Cell lines	Lung weight (mg)		Lung metastasis
	Mean $\pm$ SD Median (range)	P value	No. of mice with lung metastasis / total no. of mice
CL-1-0 vector	388.30 $\pm$ 16.53 383 (370~420)	P < 0.001 <sup>a</sup>	0 / 10
CL-1-0 si XPC	469.80 $\pm$ 22.93 467 (435~505)		6 / 10
CL-1-5 vector	461.10 $\pm$ 18.16 458 (430~480)	P < 0.001 <sup>a</sup>	5 / 10
CL-1-5 over XPC	390.30 $\pm$ 11.42 390 (375~410)		0 / 10

<sup>a</sup>CL-1-0 vector vs. CL-1-0 si XPC and CL-1-5 vector vs. CL-1-5 over XPC by the One-Way Anova test.

Table 6. Relationships between XPC mRNA expression and clinical characteristics in 126 NSCLC patients.

Parameter	Case no.	XPC mRNA <sup>‡</sup>		P value
		Low	High	
<b>Age</b>				0.102
<65	56	33 (59)	23 (41)	
≥65	70	31 (44)	39 (56)	
<b>Gender</b>				0.071
Female	29	19 (65)	10 (35)	
Male	97	45 (46)	52 (54)	
<b>Smoking status</b>				<0.001
Nonsmoker	72	48 (67)	24 (33)	
Smoker	54	16 (30)	38 (70)	
<b>Stage</b>				0.024
I+II	79	34 (43)	45 (57)	
III	47	30 (64)	17 (36)	
<b>T value</b>				0.604
1+2	96	50 (52)	46 (48)	
3+4	30	14 (47)	16 (53)	
<b>N value</b>				0.077
0	62	27 (43)	35 (57)	
1+2	64	37 (57)	27 (43)	
<b>Tumor type</b>				0.206
AD	58	33 (57)	25 (43)	
SQ	68	31 (45)	37 (55)	
<b>Local regional recurrence</b>				0.063
Negative	99	46 (47)	53 (53)	
Positive	27	18 (67)	9 (33)	

P values were derived with Fisher's exact test.

NSCLC, non-small-cell lung cancer; SD, standard deviation; T value, tumor size; N value, lymph node metastasis; AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma.

<sup>‡</sup>Divided by median value.

Table 7. Univariate analysis of influences of clinical characteristics on overall survival time of 126 NSCLC patients.

<b>Parameter</b>	<b>Case no.</b>	<b>Median survival (days)</b>	<b>Median survival (%)</b>	<b>Log-rank (P)</b>
<b>Age</b>				
<65	56	688	32.14	0.3305
≥65	70	981	40.00	
<b>Gender</b>				
Female	29	2051	58.62	0.0500
Male	97	745	29.90	
<b>Smoking status</b>				
Nonsmoker	72	1109	47.22	0.1213
Smoker	54	755	22.22	
<b>Stage</b>				
I+II	79	1174	41.77	0.0101
III	47	610	27.66	
<b>T value</b>				
1+2	96	981	40.63	0.0500
3+4	30	610	23.33	
<b>N value</b>				
0	62	1304	46.77	0.0090
1+2	64	667	26.56	
<b>Tumor type</b>				
AD	58	688	37.93	0.5114
SQ	68	981	35.29	
<b>XPC mRNA<sup>‡</sup></b>				
Low	64	688	32.81	0.0440
High	62	1284	40.32	
<b>Local regional recurrence</b>				
Negative	99	963	39.39	0.2271
Positive	27	722	25.93	

NSCLC, non-small-cell lung cancer; SD, standard deviation; T value, tumor size; N value, lymph node metastasis; AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma.

<sup>‡</sup>Divided by median value.



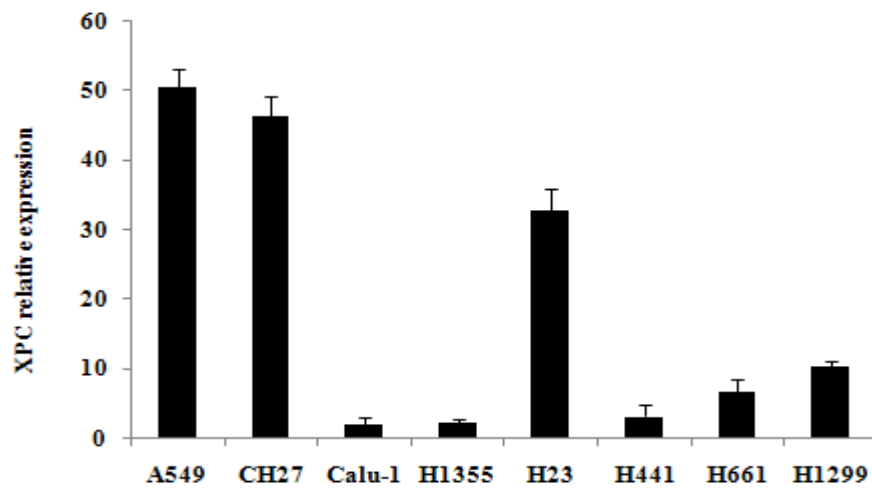
Table 8. Cox regression analysis of various potential prognostic factors in 126 NSCLC patients with different XPC mRNA expression.

<b>Variables</b>	<b>RR</b>	<b>Category</b>	<b>P value</b>	<b>95% CI</b>
<b>XPC mRNA<sup>‡</sup></b>	1.885	Low / High	0.014	1.139~3.121
<b>Age (years)</b>	0.940	≥65 / <65	0.794	0.589~1.498
<b>Gender</b>	1.779	Male / Female	0.108	0.882~3.588
<b>Smoking</b>	1.964	Smoking / Nonsmoking	0.022	1.103~3.497
<b>Tumor type</b>	1.700	AD / SQ	0.049	1.002~2.886
<b>Stage</b>	1.678	III / I, II	0.039	1.028~2.739

RR, relative risk ratio; AD, adenocarcinoma; SQ, squamous cell carcinoma.

<sup>‡</sup>Divided by the median value.

A



B

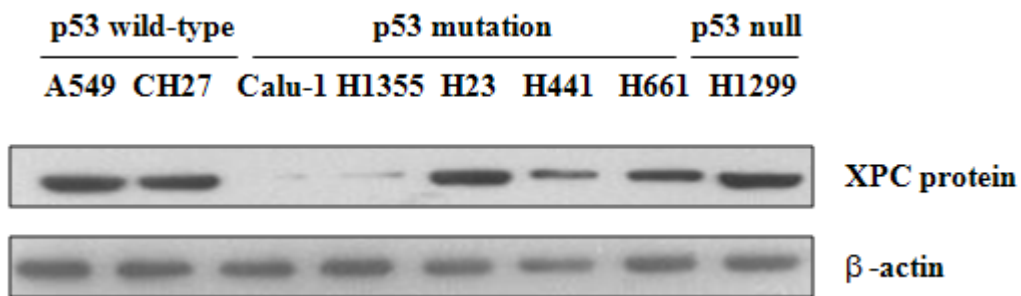
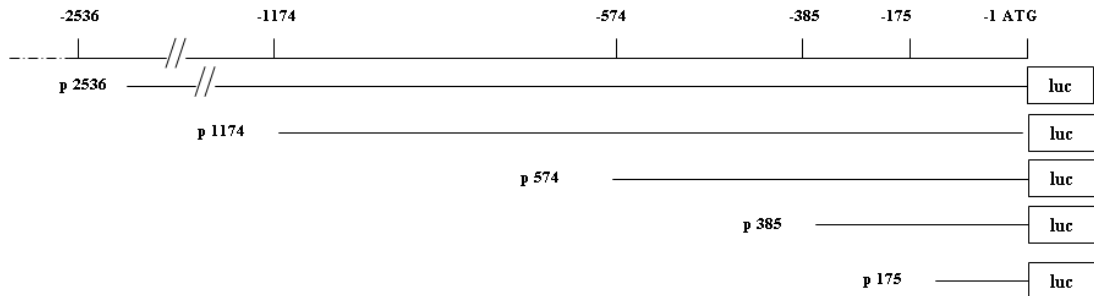


Fig. 1. Expression of XPC mRNA and protein in lung cancer cells analyzed by real-time RT-PCR (A) and Western blot (B).

A



B

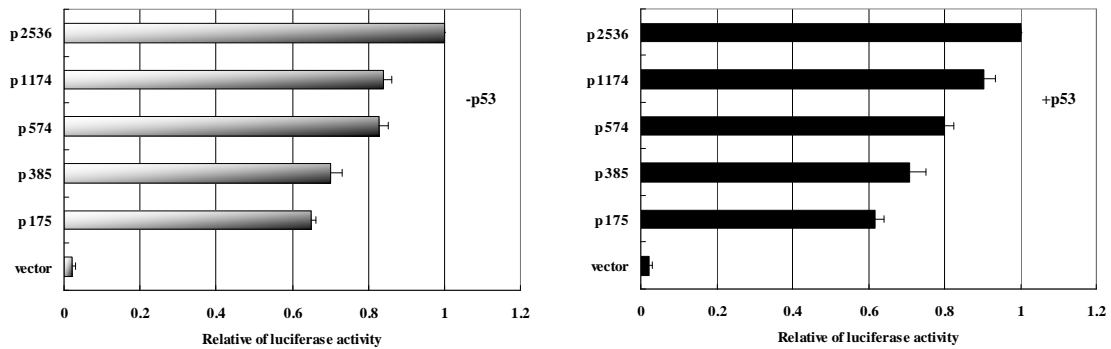
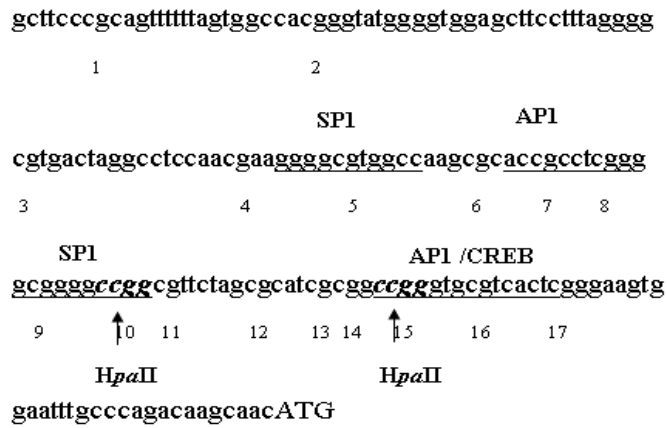


Fig. 2. Characterization of XPC promoter activity by a transient transfection luciferase reporter assay. (A) Structure of the promoter deletion constructs. (B) Luciferase activities of H1299 cells transiently transfected with p53WT or control pcDNA and with pGL3 vectors containing various XPC promoter deletion fragments.

C



D

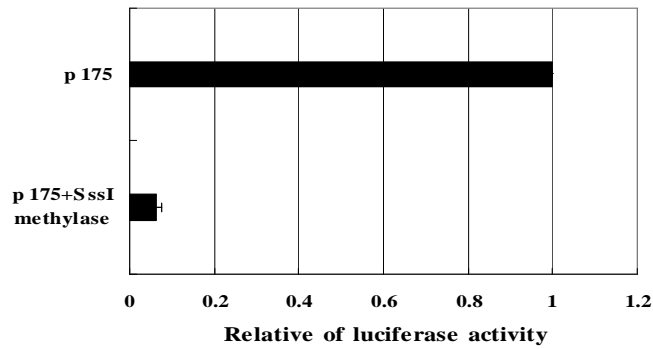


Fig. 2. (C) XPC promoter sequence between position -175 and the translation start codon. The locations of the two AP1 binding sites, the two GC-box/SP1 transcription factor-binding elements, and the 17 CpG islands are indicated and (D) luciferase activity of SssI-methylated p175 plasmid.

A

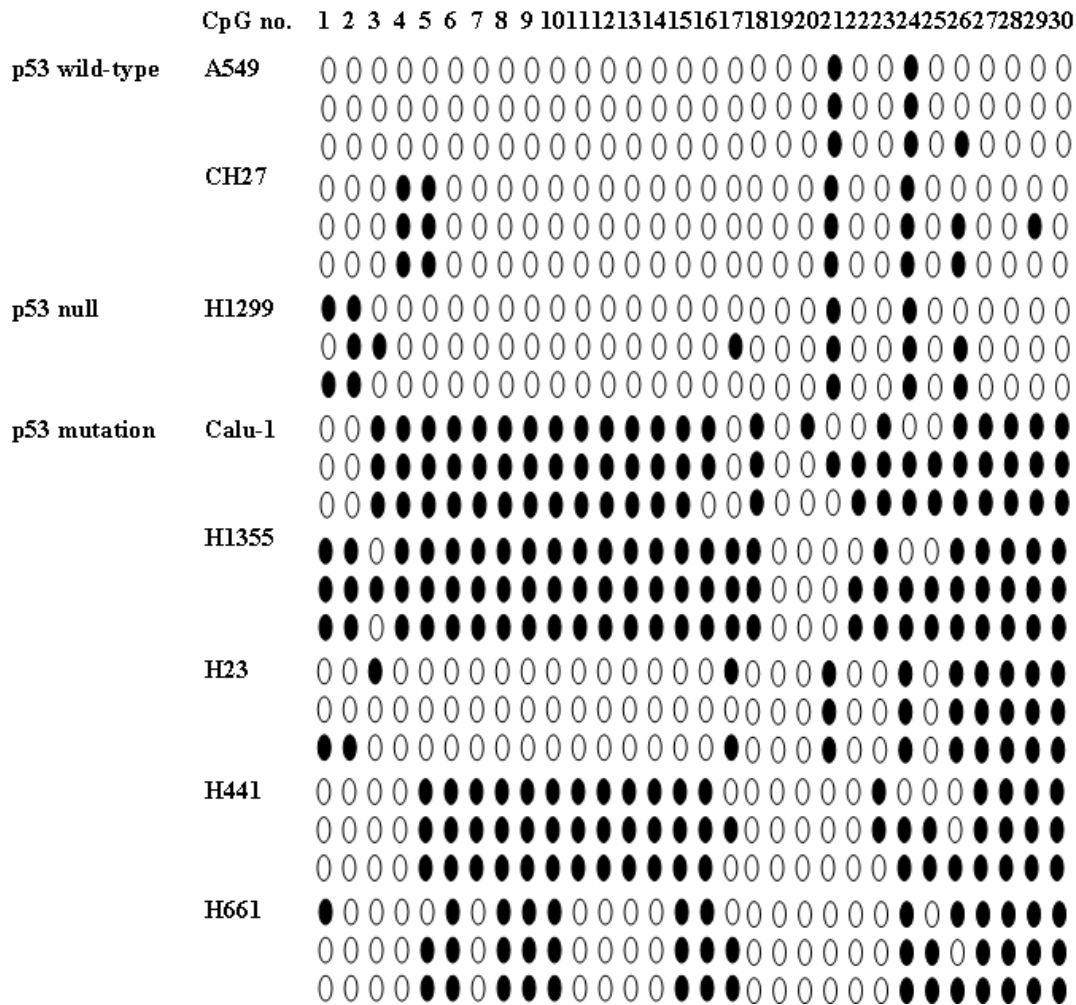


Fig. 3. (A) Methylation status of XPC promoter from eight lung cancer cell lines was analyzed by bisulfite sequencing. Three independent clones were sequenced; each row represents one sequenced allele. Each circle represents a CpG dinucleotide. (●): methylation, (○): no methylation. The numbers at the top indicate the CpG dinucleotide in the amplicon (5'→3') corresponding to those depicted in A.

B

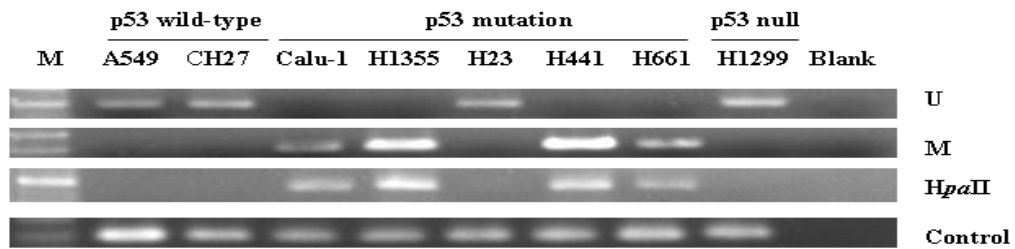


Fig. 3. (B) MSP and *HpaII*-based PCR in lung cancer cells. For *HpaII*-based PCR, products were only obtained if the target sequences were methylated at the *HpaII* sites (CCGG) in the tenth and fifteenth CpG islands. M: XPC-methylated form; U: XPC-unmethylated form; Blank: negative control; Control: PCR without prior digestion with *HpaII*.

A

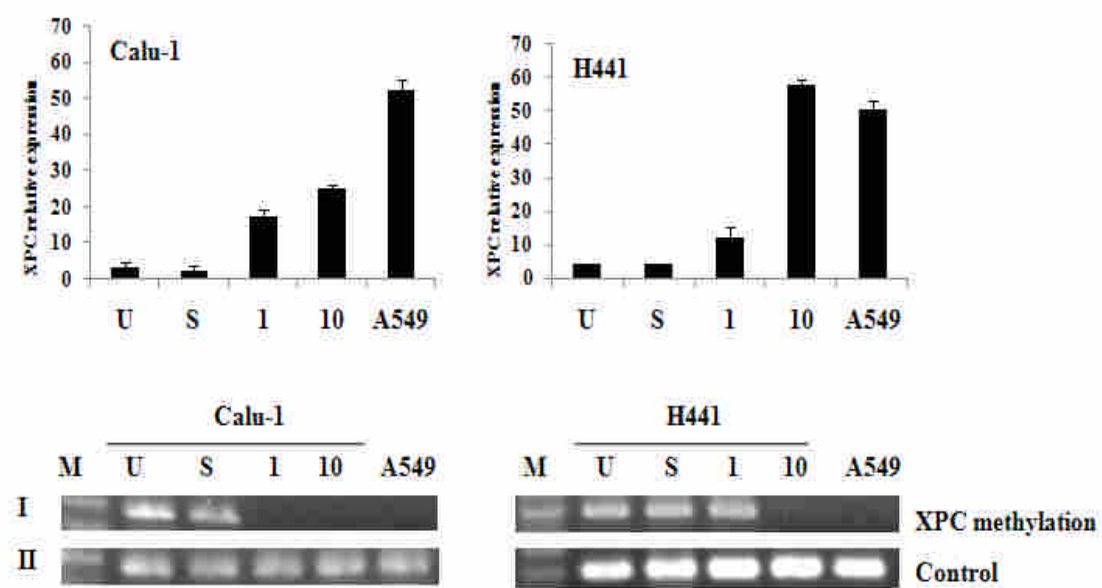


Fig. 4. (A) Expression of XPC mRNA in lung cancer cell lines after treatment with the demethylation agent 5`-aza-dC (1 or 10  $\mu$ M) for 5 days. XPC mRNA levels were analyzed by real-time RT-PCR. 18S rRNA was used as an internal control. Methylation status of the tenth and fifteenth CpG island of the XPC promoter in lung cancer cell lines after treatment with 1 or 10  $\mu$ M 5-aza-dC for 5 days was analyzed by *Hpa*II-based PCR. Products were obtained only if the target sequence was methylated at the *Hpa*II site (I: PCR after *Hpa*II digestion; II: PCR without a prior *Hpa*II digestion; U: untreated; S: PBS solvent; 1: 1  $\mu$ M 5`-aza-dC; 10: 10  $\mu$ M 5`-aza-dC; Control: A549 cells as a positive control; Blank: no cDNA control; M: molecular marker.

B

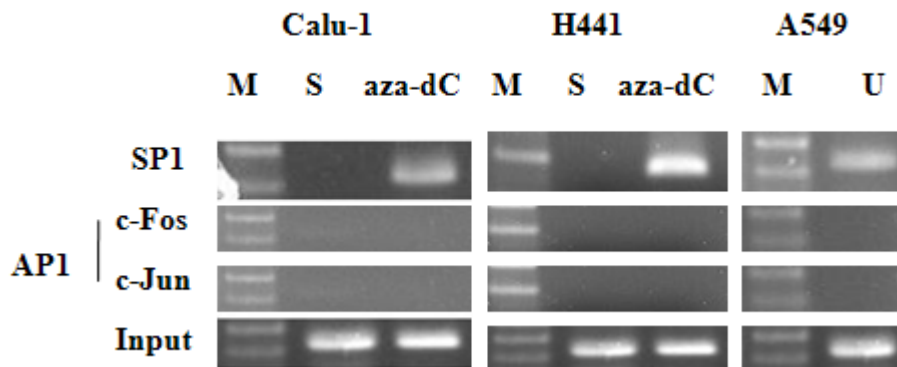
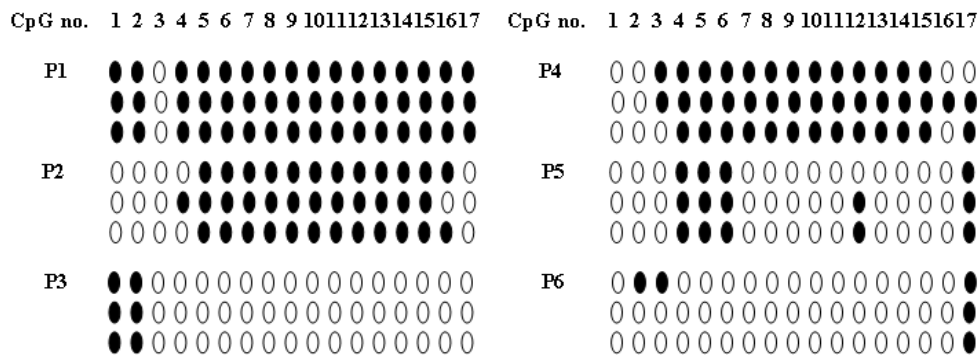


Fig. 4. (B) Recruitment of transcription factors to the XPC gene promoter during transcription silencing and de-silencing of XPC gene. CHIP analyses of the association of various transcription factors with the XPC gene promoter in Calu-1 and H441 cells after treatment with or without 5-aza-dC. Occupancy of the XPC gene promoter by these factors in A549 cells at basal condition was shown as a control (A549).



A



B

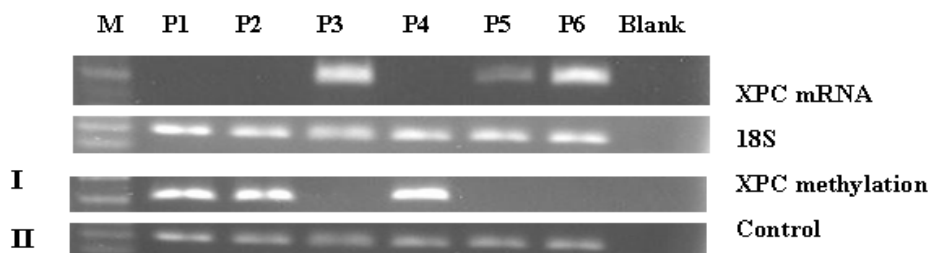


Fig. 5. (A) Methylation status of the XPC promoter in lung tumors from six lung cancer patients (P1-P6) as determined by bisulfite sequencing. Each circle represents a CpG dinucleotide. (●) methylation; (○) no methylation, (B) Expression of XPC mRNA in tumor cells of lung cancer patients as analyzed by RT-PCR. 18S rRNA was used as an internal control. Methylation status of the XPC promoter in tumor cells of lung cancer patients was analyzed by *Hpa*II-based PCR. I: PCR after *Hpa*II digestion; II: PCR without a prior *Hpa*II digestion; Blank: no cDNA control; M: molecular marker

C

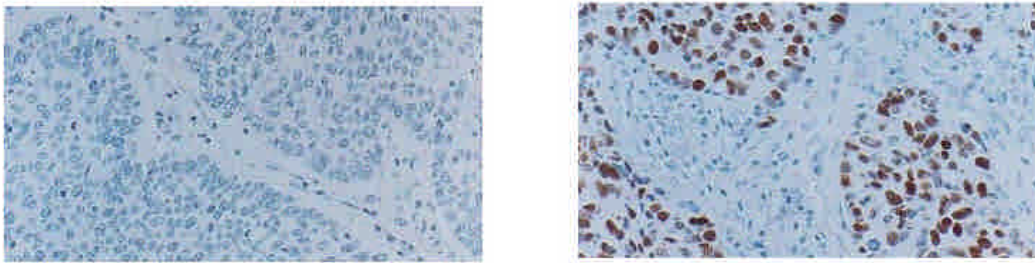
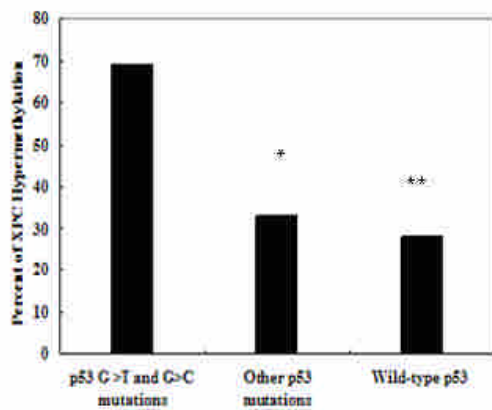


Fig. 5. (C) Representative XPC immunostaining in lung tumors. Lung tumor sections were stained with a polyclonal antibody raised against the C terminus of XPC. XPC-negative immunoreactive lung tumor tissue (left panel) and XPC-positive immunoreactive lung tumor tissue (right panel).

A



B

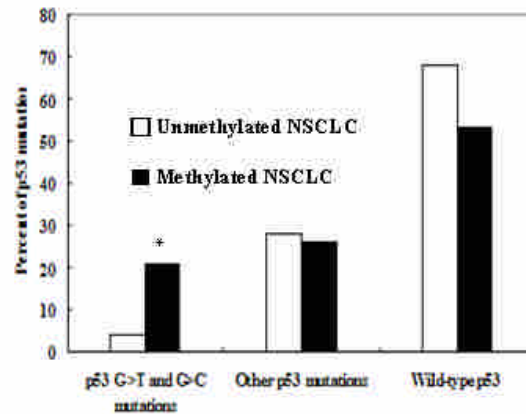
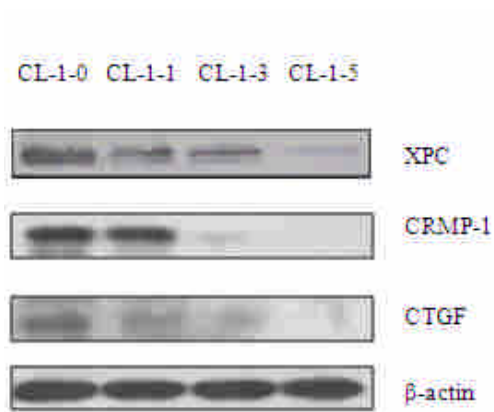


Fig. 6. (A) Percentage of tumors with XPC promoter hypermethylation by type of p53 mutation. Eleven out of 16 tumors (69%) with G to T or G to C mutations in p53 exhibited XPC hypermethylation. XPC hypermethylation was significantly less common in tumors with other p53 mutations (14/43, 33%) or with wild-type p53 (28/99, 28%). \*P = 0.012 versus tumors with G to T or C mutations; \*\*P = 0.002 versus tumors with G to T or C mutations, and p53 mutation pattern with or without promoter hypermethylation of the XPC gene. (B) The frequency of p53 G to T or G to C mutations increased from 4% in unmethylated tumors to 21% in methylated tumors. No significant change in the frequency of other p53 mutations or wild-type p53 occurred with hypermethylation of the XPC promoter (28 versus 26% for other p53 mutations; 68 versus 53% for wild-type p53).

A



B

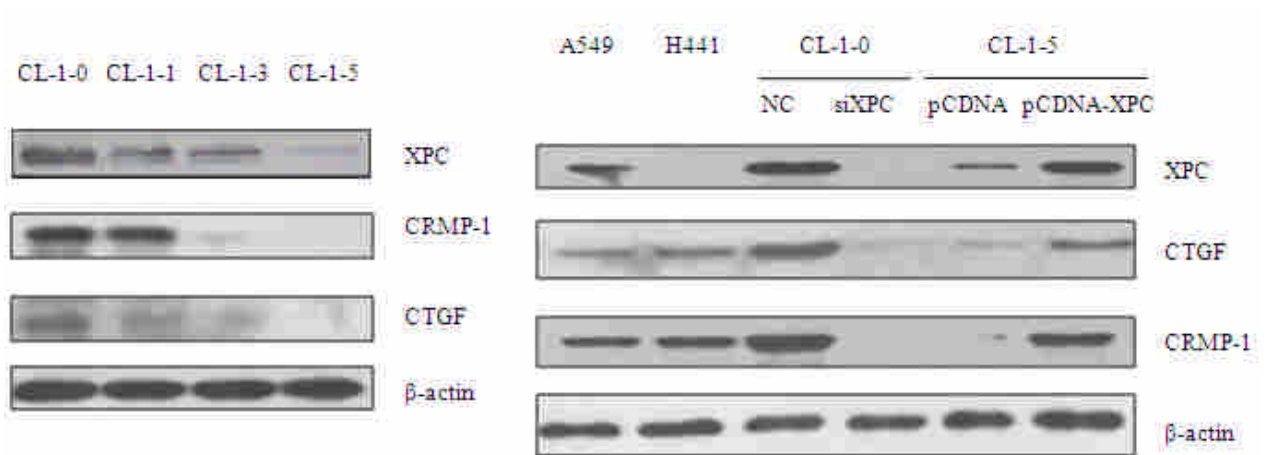


Fig. 7. (A) XPC, CRMP-1 and CTGF protein expressions evaluated by Western blotting in CL1-0, CL1-1, CL1-3 and CL1-5 cell lines with various metastatic potentials. (B) Western blotting results of various protein expressions in CL-1-0 cells with XPC RNAi and CL-1-5 cells with pCDNA-XPC as compared with CL-1-0 vector and CL-1-5 vector cells.  $\beta$ -actin served as the loading control.

C

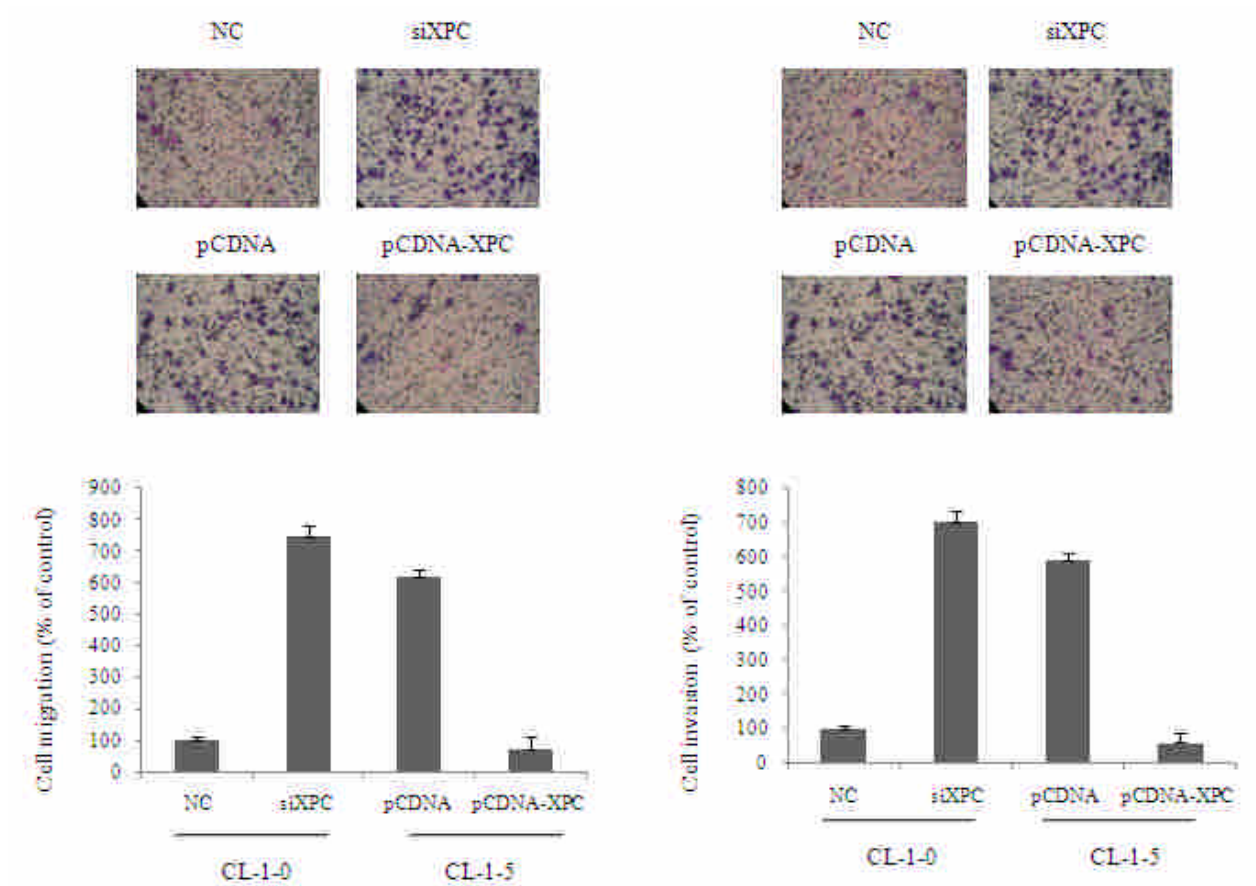
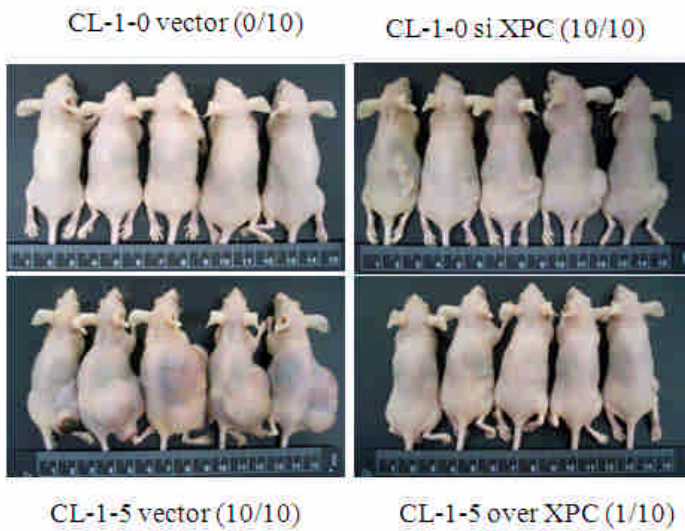


Fig. 7. (C) *In vitro* migration and invasion activity of CL-1-0 cells stably transfected with a vector encoding an interfering small hairpin RNA targeted against XPC mRNA (CL-1-0 / si) or a control vector (CL-1-0 / vector). *In vitro* migration and invasion activity of CL-1-5 cells after transient transfection with two doses of XPC as compared with vector control cells. P: CL-1-5 parental cell, V: vector. The non-transfected cell line CL-1-5, which had the highest invasive potential among these cell lines, is shown for comparison. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments.

A



B

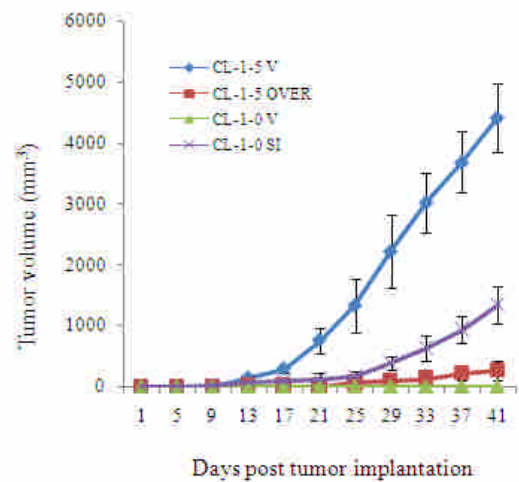


Fig. 8. XPC expression and tumor formation. (A) Representative photographs are shown above (Top, CL-1-0 group; Bottom, CL-1-5 group). (B) Mice were injected subcutaneously with cells (CL-1-5 and CL-1-0) expressing XPC (red), siXPC (purple), or empty vector controls (blue for CL-1-5 V and green for CL-1-0 V) (n = 10 per group), and tumor size was measured over time. Means and 95% confidence intervals of 10 samples per group and time point are shown.

C

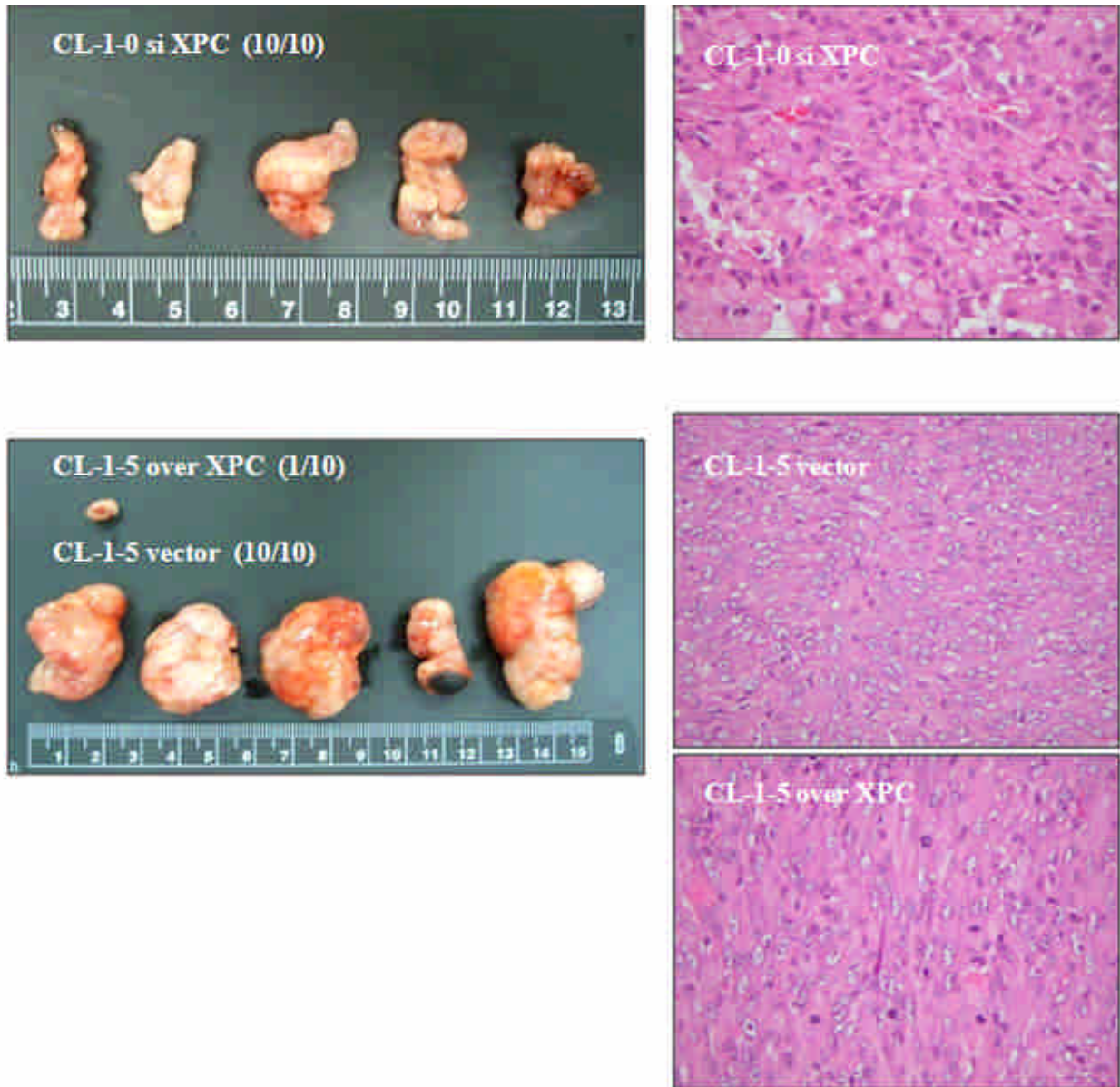


Fig. 8. (C) Left: Excised xenograft tumors from (A). Right: Histologic analyses of lung tumors.

A



B

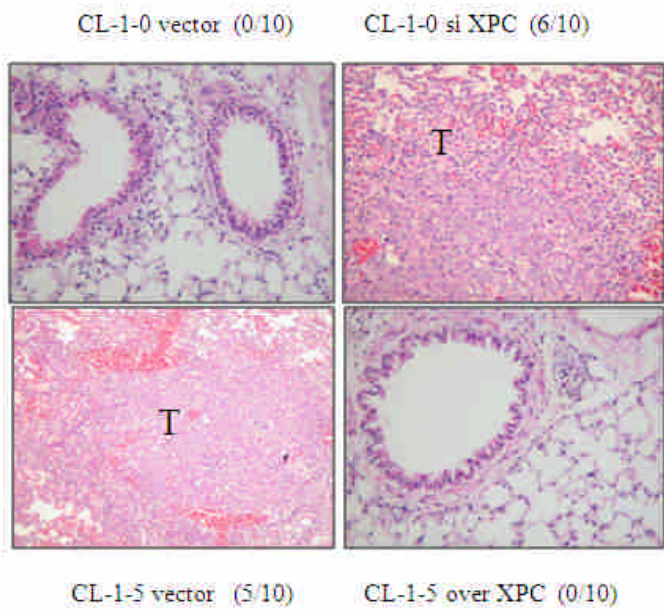
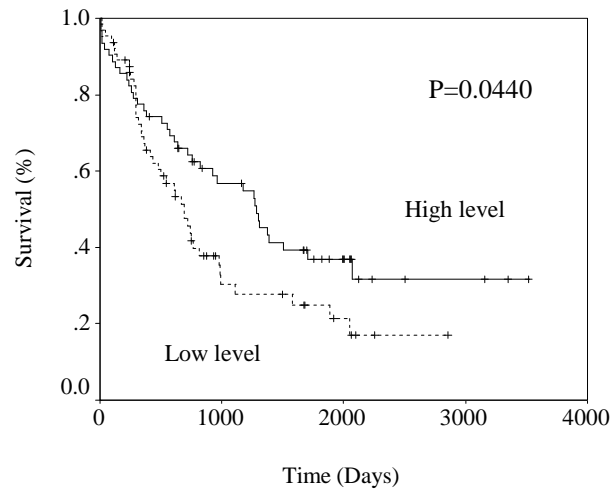


Fig. 9. (A) Lungs were excised and photographed after experimental metastasis assay. (B) Histologic analyses of lung metastatic tumors.



A



B

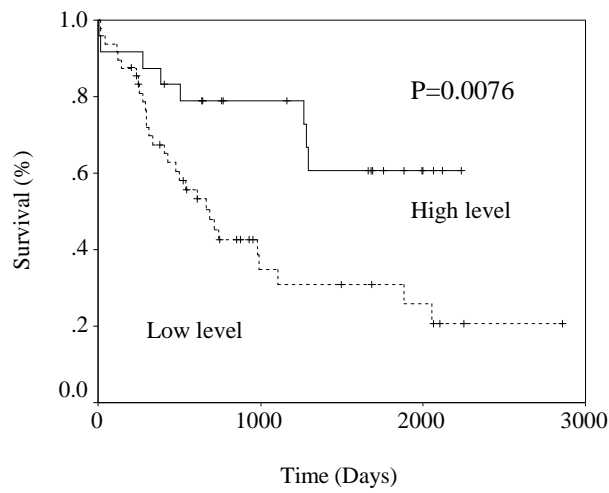


Fig. 10. Kaplan-Meier survival curves of NSCLC patient's low or high XPC mRNA expression.

(A) All patients (n = 126), (B) patients with adenocarcinoma (n = 58).

C

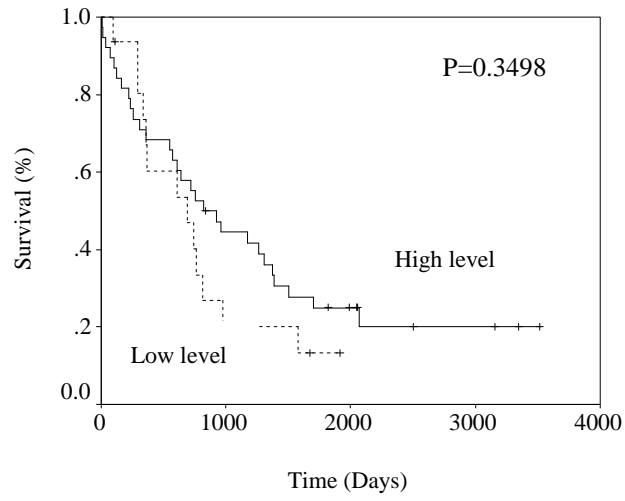


Fig. 10. Kaplan-Meier survival curves of NSCLC patient's low or high XPC mRNA expression.

(C) patients with squamous cell carcinoma (n = 68).