

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## XPC 基因在皮膚癌化之角色研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-015-  
執行期間：96年08月01日至97年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：楊仁宏  
共同主持人：李輝  
計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：賴婉文  
其他-兼任助理人員：楊連泉(臨時工)  
其他-兼任助理人員：蕭玉屏(臨時工)  
其他-兼任助理人員：林鴻欣

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97 年 11 月 08 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

XPC基因與氧化性傷害在皮膚癌化之角色研究  
研究成果報告 (精簡版)

計畫類別： 個別型

計畫編號： NSC 96-2314-B-040-015

執行期間： 96 年 08 月 01 日至 97 年 07 月 31 日

執行單位： 中山醫學大學醫學系

計畫主持人： 楊仁宏教授

共同主持人： 李輝教授(中山醫學大學分子毒理研究所)

計畫參與人員：

鄭雅文 (醫學研究所副教授)、賴婉文(醫學研究所博士生)、

張菡 (中山醫學大學病理科副教授)、楊連泉 (病理科技術員)、

蕭玉屏、林鴻欣(中山醫學大學附設醫院皮膚科住院醫師)

處理方式： 本計畫可公開查詢

中華民國 97 年 10 月 25 日

## 中文摘要

Xeroderma pigmentosum C (XPC) 是一個p53-regulated gene，在 Nucleotide excision repair (NER)中擔任早期辨識缺損DNA的重要角色，XP 基因突變，使得病人約增加1000倍之機會產生經紫外光所導致之皮膚癌。p53是一轉錄因子與細胞週期、細胞增殖、細胞凋亡之調控有關，而p53為腫瘤抑制基因與皮膚癌的癌化有密切關係；但是XPC在SCC、BCC等皮膚癌的相關研究相對較少。我們使用免疫組織染色方法來測定XPC及p53蛋白在BCC與SCC的表現，假設在非黑色素細胞癌(non-melanoma skin cancer, NMSC)中XPC的啟動子甲基化導致XPC的不表現可能與p53突變有關，並分析p53突變與XPC不活化與鱗狀細胞癌(SCC)和基底細胞癌(BCC)產生的關聯性。

## 材料及方法：

我們收集 41 例 SCC 和 56 例 BCC，另外 16 例正常上皮組織做對照組，使用免疫組織染色來測定 p53 及 XPC 表現，其陽性之判斷包括免疫染色呈色細胞所佔之比例以及細胞核染色之強度：認定陽性結果為免疫染色呈色細胞佔大於 10% 組織，而小於 10% 組織之細胞染色呈色則判斷為陰性，此外，染色的強度依強弱由陰性(-)；淡棕色(+); 棕色(++); 至深棕色(+++)可分為四級。我們進一步分析 p53 與 XPC 在 SCC 和 BCC 的表現。

## 研究結果：

我們發現 p53 或 XPC 的表現於 BCC 和 SCC 中均明顯上升 (Table 1, 2)，但兩者之表現在不同年齡、不同性別族群中均無顯著差別 (Table 3~6)。p53 於 SCC 和 BCC 中陽性比率分別為 69%和 60% (Table 1)，而 XPC 陽性比率則分別為 76% 和 81% (Table 2)，觀察其染色呈色之細胞，不論 p53 或 XPC 均以近表皮基底細胞層以及 BCC/SCC 腫瘤組織邊緣之細胞群染色較強 (Figs. 1, 2)。並發現 p53 在 SCC 中的核染色強度高於 BCC (Table 7)，但 XPC 的染色強度在 SCC 與 BCC 則無差異 (Table 8)。此外，我們也觀察到在 SCC 中，當腫瘤分化越不好(high grade SCC)時 p53 與 XPC 之陽性濃染細胞所佔比例也越高(78%與 87%)(Table 9, 10)。

進一步比較p53和XPC在同一BCC/SCC腫瘤組織中的表現是否有呈現相關性：我們發現在SCC中p53和XPC的共同表現(co-expression)有54%，BCC中p53和XPC的共同表現者亦有50%，但在BCC和SCC中p53單獨表現者有11%與15%，在BCC和SCC中XPC單獨表現者更分別有30%與22% (Table 11&12)。

p53 和 XPC 在正常表皮組織中亦有表現(Table 1 & 2)，但侷限於表皮的下三分之一處，且其染色的強度均較 SCC 和 BCC 弱，p53 與 XPC 淡棕色(+)-比例

均為 87%，並發現 p53 和 XPC 呈共同表現(co-expression)，即 p53 和 XPC 呈現的細胞染色強度與陽性細胞出現的位置相近(Table 13)。

**結論：**

我們觀察到在正常的上皮組織中，p53 和 XPC 表現且 co-expression 主要侷限於表皮的下三分之一處，在 SCC 和 BCC 中則 p53 和 XPC 則呈現多樣性的表現。在 SCC 腫瘤中，p53 與腫瘤分化程度有關，在分化不良呈色比例高且染色深，而 XPC 在 SCC 不論其分化如何，表現都相當明顯。也發現 p53 和 XPC 在 SCC 和 BCC 腫瘤組織中常呈共同表現，此結果可能因 XPC 的基礎表現和受 DNA damage-inducible XPC 的表現均受到 p53 調控有關，但是，XPC 在 SCC 和 BCC 腫瘤組織中可單獨表現，而 p53 卻不表現的現象，尚待進一步的研究證實。

**Key words:** Xeroderma pigmentosum group C (XPC)， p53，鱗狀細胞癌(SCC)，基底細胞癌(BCC)，免疫組織染色

## Abstract

Xeroderma pigmentosum group C (XPC) is a p53-regulated gene, and is responsible for the early recognition of defective DNA in the process of nucleotide excision repair (NER). Individuals carrying a mutation in one of the XP genes (XPA to XPG) exhibit marked photosensitivity and a >1000- fold increase in the occurrence of skin cancers. P53 is an intensively studied protein, and is a tumor suppressor essential for the regulation of cell proliferation, cell cycle, apoptosis and DNA repair, and its inactivation is considered a key event in human carcinogenesis. Lee et al. have demonstrated that XPC mutation may involve in lung cancer carcinogenesis. However, little information is available on the role of p53 and XPC in non-melanocytic skin cancers (NMSC). We investigate the roles of p53 and XPC in human skin squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC) by immunohistochemistry, assays for XPC promoter methylation, RT-PCR for quantifying XPC mRNA levels, and DNA sequencing to detect p53 point mutations.

### Materials and methods:

We collected tumor samples from patients of SCC (n=41), BCC (n=56) and normal human skin (n=16) for immunohistochemical studies to investigate the tissue expressions of p53 and XPC. The intensity of the staining was classified into 4 grades: no staining (-); faint bronze (+); bronze (++) and dark bronze to brown (+++). In addition, cells-stained less than 10% of a tumor was defined as negative, otherwise >10% was positive.

### Results:

We demonstrated that the expressions of both p53 and XPC increased in the lower third of the epidermis in normal skin. The expressions of p53 and XPC were both increased in SCCs and BCCs. The positive rates of p53 in SCC and BCC were 68% and 61%, respectively, and the positive rates of XPC in SCC and BCC were 76% and 80%, respectively. Nuclear staining of p53 in SCC was stronger than that in BCC, but the intensity of XPC was similar in both SCCs and BCCs. The expressions of p53 and XPC for SCCs and BCCs in different age and gender groups disclosed no significant differences. Co-expressions of p53 and XPC accounted for most of the cases (SCC: 56%; BCC: 50%); however, XPC and p53 was positively expressed alone and *vice versa* in BCC and SCC.

**Conclusions:**

We demonstrated that p53 and XPC co-expressed in more than half for SCCs and BCCs. The positivity staining of p53 and XPC were both increased in BCCs and SCCs, especially over the progenitor areas of the tumor. Though expressions of p53 and XPC were also observed among normal skin specimens, the reaction was relatively weak. The expressions of p53 revealed higher proportion and stronger intensity in high grade (poor-differentiated) than that in low grade (differentiated) SCCs. However, XPC had strong expressions either in proportions or in intensity regardless of the differentiation of SCC. Further investigations are mandatory to explore the roles of p53 point mutations, and XPC promoter modifications in the tumorigenesis of non-melanoma skin cancers.

**Key words:** Xeroderma pigmentosum group C (XPC), p53, Non-melanoma skin cancer (NMSC), Basal cell carcinoma (BCC), Squamous cell carcinoma (SCC), Immunohistochemistry

## 前言

色素性乾皮病(Xeroderma pigmentosum, XP)為遺傳性XP基因產生突變，XP基因有XP-A到-G 共7群，主要參與NER nucleotide excision repair (NER)，XP-A到-G的基因有缺損就會產生NER的缺陷，使得XP病人皮膚極度光敏感，而較一般人有高1000倍以上的機會罹患皮膚癌。其中XPC主要受p53調控、是一個p53-regulated gene，在NER中的global genomic repair (GGR)路徑中擔任早期辨識缺損DNA的重要角色，XPC蛋白之半衰期約為6小時，當DNA受損時，XPC會明顯增加活化進而啟動p53-dependent NER pathway，XPC和hHR23B以及centrin 2形成複合體，藉以早期辨識出受損部位並進一步結合，引發後繼XPG等蛋白進一步的修補反應，但同時經proteasome降解。p53是一轉錄因子與細胞週期、細胞增殖、細胞凋亡之調控有關，且其為腫瘤抑制基因，紫外線誘使p53發生C->T或CC-> TT突變，廣泛見於非黑色素細胞皮膚癌(non-melanoma skin cancer, NMSC)尤其是SCC和BCC (Marrot L, 2008; Rebel H *et al.*, 2005; Rigel DS, 2008)，突變後p53蛋白之半衰期由原本之半小時延長至數百小時，且失去其正常生理功能，並累積於細胞核中；此外p53亦可藉由base excision repair(BER)修補氧化性核酸傷害 (Shaqil NK and Rainbow AJ, 2008)。

當細胞受到傷害比如輻射、紫外線或氧化性傷害等，藉由p53促進XPC活化及後續之DNA修補機制(Sugasawa K, 2008)。研究顯示p53突變或其蛋白變性與NMSC的癌化有密切關係，過去研究顯示在SCC、BCC中p53會呈過度表現 (Gusterson *et al.*, 1991; Mcgregor *et al.*, 1992; Hussein *et al.*; 2004)。但是XPC在SCC、BCC等皮膚癌的相關研究相對較少，李輝等人在肺癌觀察到啟動子(promoter)甲基化造成的XPC缺失與p53發生突變有關(Wu *et al.*, 2007)。因此，本計劃中我們首先使用免疫組織染色方法來測定XPC及p53蛋白在BCC與SCC的表現，也進一步假設在NMSC中XPC的啟動子(promoter)甲基化導致XPC的不表現可能與p53突變有關，並分析p53突變與XPC不活化與NMSC產生的關聯性。

## 研究材料及方法

本研究通過中山醫學大學附設醫院 IRB 核准通過(CS08118)，我們收集 41 例 SCC 和 56 例 BCC，病患於中山醫學大學附設醫院初次診斷且未接受過任何化學治療，並收集 16 例正常人之皮膚檢體做對照組。我們使用免疫組織染色方法來測定 XPC 及 p53 蛋白在 BCC 與 SCC 的表現，利用 DNA 定序法偵測 p53 突變，應用 Methylated- specific PCR (MSP)及 bisulfite 定序來研究 XPC 的 promoter 甲基化情形，並以 RT-PCR 定量 XPC mRNA，以探討 XPC 與 p53 突變在 BCC 與 SCC 的關連性。

### (1) 免疫組織染色

我們使用免疫組織染色 Avidin-biotin complex 方式(Streptavidin-HRP)來測定 XPC 及 p53 表現。染色結果由一位皮膚專科醫師和一位病理科專科醫師，共兩位醫師分別以顯微鏡判讀；XPC 和 p53 染色有反應之細胞會於細胞核呈色，其陽性之判斷包括免疫染色呈色細胞所佔之比例以及細胞核染色之強度：認定陽性結果為免疫染色呈色細胞佔大於 10%組織，而小於 10%組織之細胞染色呈色則判斷為陰性，此外，染色的強度依強弱由陰性(-)；淡棕色(+); 棕色(++); 至深棕色(+++)可分為四級。我們進一步利用 SPSS 統計軟體 (Version 11.0 SPSS Inc., Chicago, IL)以 student t-test 和 Fisher's exact test (two-tailed)分析比對 p53 與 XPC 在 SCC 和 BCC 的表現之意義。

### (2) DNA 直接定序偵測 p53 突變

我們使用 DNA lysis buffer 溶解皮膚癌組織，接著加入 proteinase K 及 phenol-chloroform 萃取出 DNA，並再加入 ethanol 和 linear polyacrylamide 以增加 DNA 的含量。我們偵測 p53 基因 exon 5 至 exon 8，先取 1 µl genomic DNA，分別加入 20 pmol 特定序列起動子、5 µl PCR reaction buffer、0.5 mM dNTPs、2.5 units of Taq polymerase (Takara Shuzo, Shiga, Japan)，直至最終體積為 50 µl。起動子的序列分別如下：p53 (exon 5: sense5'- TGCCCTGACTTTCAACTCTG-3'/ antisense5' GCTGCTCACCATCGCTATC -3'; exon 6: sense5'- CTGATTCCTCACTGATTGCT -3'/ antisense5' AGTTGCAAACCAGACCTCAGG -3'; exon 7: sense5'- CCTGTGTTATCTCCTAGGTTG -3'/ antisense5' GCACAGCAGGCCAGTGTGCA -3'; exon 8: sense5'- GACCTGATTCCTTACTGCC-3'/ antisense5' TCTCCTCCACCGCTTCTTGT -3')。我們進行 PCR 的步驟為：94 °C 作用 5 分鐘，進行 35 個循環 (94 °C 作用 40 秒，54 °C 作用 40 秒，72 °C 作用 1 分鐘)，接著使用 autosequencing system (3100 Avant Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA)進行 p53 序列判讀偵測有無突變。

### (3) XPC promoter 甲基化的偵測：MSP 與 Bisulfite 定序

**Methylation-specific PCR(MSP)**：我們先取 1µg DNA 進行酵素甲基化的步驟，加入 1µl SssI、5µl NEBuffer 2 (New England BioLabs)、5µl Sadenosylmethionine (1.6 mM)直至最終體積 50µl，於 37°C 作用 2 小時，再於 65°C 作用 20 分鐘。以 phenol-chloroform 純化甲基化的 DNA，之後加入 ethanol。取 25 ng DNA，分別加入 1 µl 起動子、2 µl of 2.5 mM dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, USA)、 2.5 µl of 10x PCR buffer、1.25 µl of 50 mM MgCl、0.1 µl of Platinum Taq DNA



polymerase、以及二次水直至最終體積為 25  $\mu$ l。XPC 起動子序列為：sense5'-AAGACTTGGAGTTTCAGGCAAAA-3', antisense5'-TCA GGAGATGCCGCTTCAG-3'。我們進行"Touchdown PCR"步驟：95  $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘，進行 20 個循環 (94  $^{\circ}$ C 作用 30 秒，65  $^{\circ}$ C 作用 30 秒，72  $^{\circ}$ C 作用 30 秒)，再進行 15 個循環 (94  $^{\circ}$ C 作用 30 秒，55  $^{\circ}$ C 作用 30 秒，72  $^{\circ}$ C 作用 30 秒)，72  $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘。

**Bisulfite 定序：**首先使用 EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)將皮膚癌組織 DNA 以 bisulfite 處理，接著於 99 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘、60 $^{\circ}$ C 作用 25 分鐘、99 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘、60 $^{\circ}$ C 作用 85 分鐘、99 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘、60 $^{\circ}$ C 作用 175 分鐘、保存於 20 $^{\circ}$ C。我們將有 bisulfite converted DNA，加入 560  $\mu$ l of Buffer BL，12,000 rpm 離心 1 分鐘，加入 500  $\mu$ l of Buffer BW 在室溫中作用 15 分鐘，離心去除上清液，並以 Buffer BW 充洗 2 次，離心去除上清液，加入 20  $\mu$ l 的 Buffer EB，以 Nano-drop spectrophotometer 偵測 DNA 濃度。再取 25 ng 有經 bisulfite 處理過的 DNA，分別加入 1  $\mu$ l 起動子、2  $\mu$ l of 2.5 mM dNTP mix (Invitrogen)、2.5  $\mu$ l of 10x PCR buffer、1.25  $\mu$ l of 50 mM MgCl、0.1  $\mu$ l of Platinum Taq DNA polymerase、以及二次水直至最終體積為 25  $\mu$ l 進行 PCR。XPC 起動子序列為：sense5'-AAGACTTGGAGTTTCAGGCAAAA-3', antisense5'-TCAGGAGATGCCGCTTCAG-3'。接著使用 autosequencing system (3100 Avant Genetic Analyzer; Applied Biosystems, CA)進行 XPC 序列判讀。

#### (4) Real-time PCR定量XPC mRNA：

我們使用 Applied Biosystems (ABI, Foster City, Calif) Prism 7000 序列偵測系統進行 Real-time PCR 來。分別加入 100 nM 的 XPC 起動子、5  $\mu$ l of reverse-transcription reaction solution、12.5  $\mu$ l Synergy Brands (SYBR) Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, Calif) 直至最終體積為 25  $\mu$ l。進行 RT-PCR 的步驟為：50 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘，95 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，進行 40 個循環 (95  $^{\circ}$ C 作用 15 秒，60 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘，72  $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘)。XPC 起動子序列為：sense 5'-AAGACTTGGAGTTTCAGGCAAAA-3', antisense 5'-TCAGGAGATGCCGCTTCAG-3'。

### 實驗結果

我們發現 p53 或 XPC 的表現於 BCC 和 SCC 中均明顯上升 (Table 1&2)，但兩者之表現在不同年齡、不同性別族群中均無顯著差別 (Table 3~6)。p53 於 SCC 和 BCC 中陽性比率分別為 69% 和 60% (Table 1)，而 XPC 陽性比率則分別為 76% 和 81% (Table 2)，觀察其染色呈色之細胞，不論 p53 或 XPC 均有一共同特色主要分布於表皮的下三分之一處、表皮基底細胞層以及 BCC/SCC 腫瘤組織邊緣之

細胞群染色較強 (Figs. 1&2)，相對而言，分化明顯之細胞以及越近腫瘤組織中心處分布之細胞其呈色之比例則越低。此外，我們也觀察到在 SCC 中當腫瘤惡性度越高時 XPC 之陽性濃染細胞所佔比例高達(75%)(Table 9)，p53 也有類似表現，但比例較低(Table 10)。此外，並發現在 SCC 中 p53 的核染色強度高於 BCC，但 XPC 的染色在 SCC 與 BCC 則無此明顯差異 (Table 7&8)；但是在兩例 basosquamous type 的 BCC 的檢體中，其 XPC 和 p53 兩者癌細胞核染色陽性率與強度均高且明顯。

在 SCC 中，當腫瘤分化越不好(high grade SCC)時 XPC 之陽性濃染細胞所佔比例也越高(75%)(Table 9)，p53 則無此現象(Table 10)；但在 BCC 的 basosquamous type 兩個組織檢體中，其 p53 或 XPC 兩者染色陽性率均高且呈色明顯。

進一步比較p53和XPC在同一BCC/SCC腫瘤組織中的表現是否有呈現相關性：我們發現在SCC中p53和XPC的共同表現(co-expression)有54%，BCC中p53和XPC的共同表現者亦有50%，但在BCC和SCC中p53單獨表現者有11%與15%，在BCC和SCC中XPC單獨表現者更分別有30%與22% (Table 11&12)。

p53 和 XPC 在正常表皮組織中亦有表現(Table 1 & 2)，但侷限於表皮的下三分之一處，且其染色的強度均較 SCC 和 BCC 弱，p53 與 XPC 淡棕色(+)之比例均為 87%，並發現 p53 和 XPC 呈共同表現(co-expression)，即 p53 和 XPC 呈現的細胞染色強度與陽性細胞出現的位置相近(Table 13)。

## 討論

p53作用廣泛與細胞週期、細胞凋亡、DNA受損、DNA修補等機制調控都有密切關係(Vousden, 2007)。XP基因有XP-A到-G 共7群，XP基因主要參與nucleotide excision repair (NER)，NER又有global genomic repair (GGR)與transcription-coupled repair(TCR) 兩種修補路徑(Sugasawa K, 2008)，XP-A到-G中有任何基因缺損就會引產生NER的缺陷。其中XPC主要受p53調控，並在NER中的GGR路徑中擔任早期辨識缺損DNA的重要角色。當細胞受到傷害比如輻射、紫外線或氧化性傷害等，藉由p53促進XPC活化及後續之DNA修補機制(Sugasawa K, 2008)。XPC之半衰期約為6小時(Okuda Y et al., 2004)，當DNA受損時，XPC會明顯增加活化，並和hHR23B以及centrin 2形成複合體，藉以於核酸修補機制的早期辨識出受損部位並進一步結合，同時經proteasome降解後才引發後繼XPG的進一步修補反應。眾所皆知紫外線的照射與non-melanoma skin cancer(NMSC)的發生息息相關，紫外線誘使p53發生C->T或CC-> TT突變，廣泛見於NMSC尤其是SCC和BCC，突變後之p53失去其正常生理功能，但p53蛋白之半衰期由原本之半小時延長至數百小時，並累積於細胞核中。

我們發現在正常的上皮組織中，表現主要侷限於表皮的下三分之一處，其染色的強度較弱，p53和XPC兩者之染色表現也呈現相關性，當p53表現時XPC才表現，當一方不表現時另一方亦不表現，並且注意到兩者呈現位置相近。此現象可以推測：在正常組織中細胞仍受到環境微量傷害，為修補受損之核酸在正常的生理狀態下所產生之修補機置，因此p53和XPC之呈色大多在保有分裂增殖能力的靠近基底層細胞處表現，且其蛋白質強度(intensity)並不如SCC和BCC般呈現過度表現(Barzilai A et al., 2007; Benjamin CL et al., 2008)，此一發現也支持XPC的基礎表現(basal expression)受到p53調控(Adimoolam, 2002)。

在本實驗中我們嘗試分析p53和XPC的表現在SCC不同的癌病理分期、以及BCC不同的病理型態分類中是否有表現的差別意義：結果發現在SCC中，p53高陽性濃染細胞所佔比例在low grade與high grade SCC中分別為59%與78% (Table 9)，顯示p53蛋白過度表現和細胞之增殖相關，在腫瘤組織中分裂增殖越旺盛之處其呈色比例越高且染色程度越深，此與先前的研究相符合(Gusterson et al., 1991, Mcgregor et al., 1992; Stratigos AJ et al., 2005; Barzilai et al., 2007)，Flores and McCord(1997)指出分裂增殖中的transformed cell其氧化壓較differentiated cell為高，可能因此與p53突變機會增加而p53蛋白積留癌細胞核內有關；然而XPC陽性染色細胞在 low grade與high grade SCC腫瘤中所佔比例分別為76%與87%，都相當的高，推測原因可能顯示SCC之癌細胞辜不論其分化如何，其DNA受損之可能性已相當明顯，因此導致XPC的表現也相對增加，亦或其崩解速度較緩，最近又知道XPC可以加速hOGG1的活性而降低DNA的氧化性傷害(D'Errico et al., 2006)，或許亦與此有關，然而其真正原因則有待進一步探究。而由於本研究中的BCC檢體大多數為nodular type，因此無法進一步分析p53和XPC與BCC病理分型間之關係。

我們觀察到在腫瘤組織中SCC有54% (Table 11)和 BCC 有50%(Table 12)，其p53和XPC呈共同表現(co-expression)，此結果可能因XPC的基礎表現(basal level)和受DNA damage-inducible XPC的表現均受到p53調控有關(Admoolam S, 2002)。另觀察到XPC或p53在BCC與SCC中亦可單獨表現，p53在BCC和SCC中單獨表現者有11%與15%，XPC在BCC和SCC中單獨表現者更分別有30%與22%，如前述突變後之p53蛋白之半衰期大幅延長並積累於細胞核中，而XPC主要受p53調控、且XPC在修補過程中會與hHR23B、centrin 2形成複合體，後經proteasome降解，因此推估，在BCC和SCC中，p53單獨表現而XPC不表現較可理解，但XPC單獨表現而p53不表現的現象，是否意味XPC經某種機制例如ubiquitylation 或 sumoylation的保護而不降解(Sugasawa K et al., 2005; Wang QE et al., 2007)，因而導致XPC半衰期延長並積累於細胞核中，有待進一步的研究證實。

## 計畫執行限制

免疫組織染色方法研究p53和XPC蛋白在SCC和BCC組織的表現，所使用之抗體會同時偵測wild type 與 mutant或修飾過之p53和XPC蛋白，是一大限制；另外本研究中的BCC檢體大多數為nodular type，因此有必要收集更多的BCC病例，進一步分析p53和XPC與BCC病理分型間之關係

除上述免疫組織染色方法研究，我們也進行DNA直接定序偵測皮膚癌組織的p53突變，我們定序p53最容易發生突變的exon 5至exon 8，但並無發現p53突變，初時使用福馬林固定組織檢體抽取DNA，隨後改用新鮮冰凍組織，檢討原因可能是福馬林固定之檢體DNA斷裂，或皮膚癌組織仍有包含部份正常的皮膚細胞，因此，我們擬收集更多的病例，並擬改採microdissection的方法精準地分離出皮膚癌組織DNA、並直接定序法偵測p53突變，希望能有所發現。

此外，我們也正以methylated-specific PCR (MSP)及bisulfite 定序進行XPC啟動子甲基化研究，也進行real-time PCR來測定XPC的mRNA的表現，目前實驗仍在進行中。

## 計畫成果自評

我們的研究顯示，在正常的上皮組織中，p53 和 XPC 表現且 co-expression 主要侷限於表皮的下三分之一處，在 SCC 和 BCC 中則 p53 和 XPC 則呈現多樣性的表現。在 SCC 腫瘤中， p53 與腫瘤分化程度有關，在分化不良呈色比例高且染色深，而 XPC 在 SCC 不論其分化如何，表現都相當明顯。也發現 p53 和 XPC 在 SCC 和 BCC 腫瘤組織中常呈共同表現，此結果可能因 XPC 的基礎表現和受 DNA damage-inducible XPC 的表現均受到 p53 調控有關，但是，XPC 在 SCC 和 BCC 腫瘤組織中可單獨表現，而 p53 卻不表現的現象，尚待進一步的研究證實。由於在 XPC 啟動子甲基化與 XPC 的 mRNA 定量的研究進度不如預期，因此 p53 和 XPC 在 BCC 與 SCC 等皮膚癌之角色仍待進一步釐清。

## 參考文獻

1. Adimoolam S, James MF. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 12985-90
2. Backvall H, Wolf O, Hermelin H et al. The density of epidermal p53 is higher adjacent to squamous cell carcinoma in comparison with basal cell carcinoma. Br J Dermatol 2004; 150, 259-266.

3. Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, et al. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol.* 2007; 57:669-76.
4. Benjamin CL, Ullrich SE, Kripke ML, et al., p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol.* 2008;84:55-62.
5. Chang YC, Jan KY, Cheng CA, et al. Direct involvement of the tumor suppressor p53 in nucleotide excision repair. *DNA Repair* 2008; 7:751-761.
6. Flores SC, McCord JM. Redox regulation by the HIV-1 Tat transcriptional factor. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997:117–38.
7. Nishi R, Okuda Y, Watanabe E, et al. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Mol Cell Biol.* 2005;25:5664-74.
8. Okuda Y, Nishi R, Ng JM, et al. Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst).* 2004;3:1285-95.
9. Shaqil NK, Rainbow AJ. UV-inducible base excision repair of oxidative damaged DNA in human cells. *Mutagenesis.* 2008;
10. Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E, et al. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005; 19:180-6.
11. Sugawara K, Okuda Y, Saijo M, et al. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell.* 2005;121:387-400.
12. Sugawara K. Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis* 2008; 29:455-65
13. Wang Q-E, Praetorius-Ibba M., Zhu Q., et al. Ubiquitylation-independent degradation of Xeroderma pigmentosum group C protein is required for efficient nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 2007;35: 5338-5350
14. Wu YH, Cheng YW, Chang JT, et al. Reduced XPC messenger RNA level may predict a poor outcome of patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2007;110:215-23.

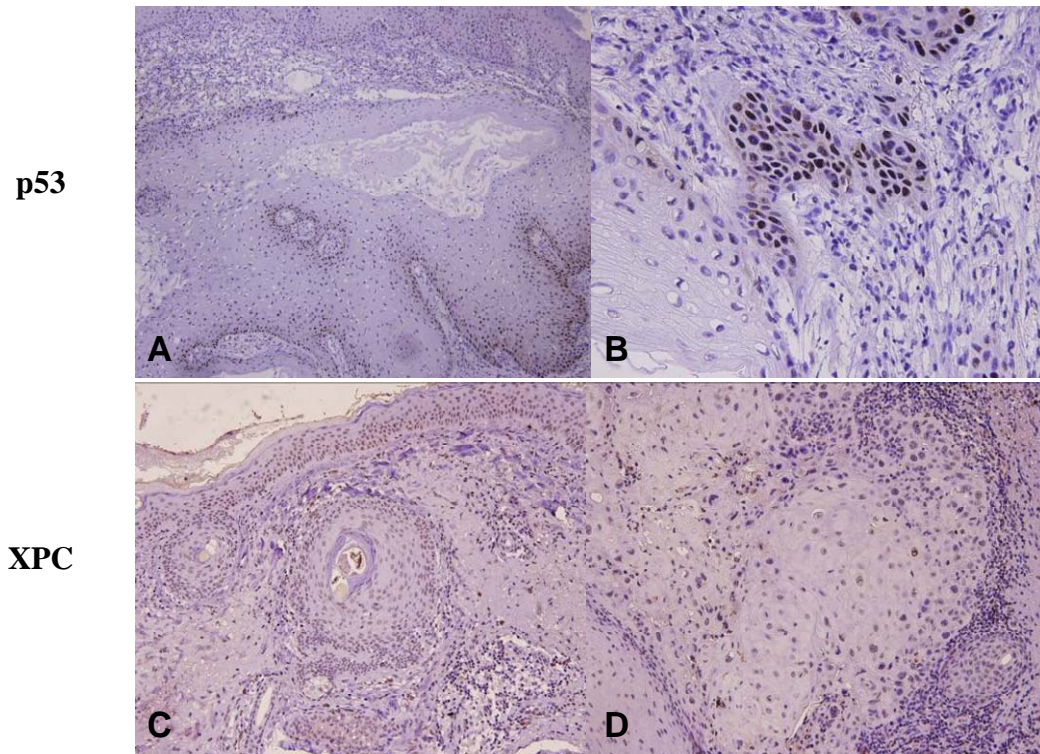


Fig. 1 The immunohistochemical staining of squamous cell carcinoma. P53-stained cells distributed mainly over progenitor cells and undifferentiated cells in a well-differentiated SCC (A & B). XPC-stained cells distributed mainly over progenitor cells and undifferentiated cells in a well-differentiated SCC (C & D) (X200).

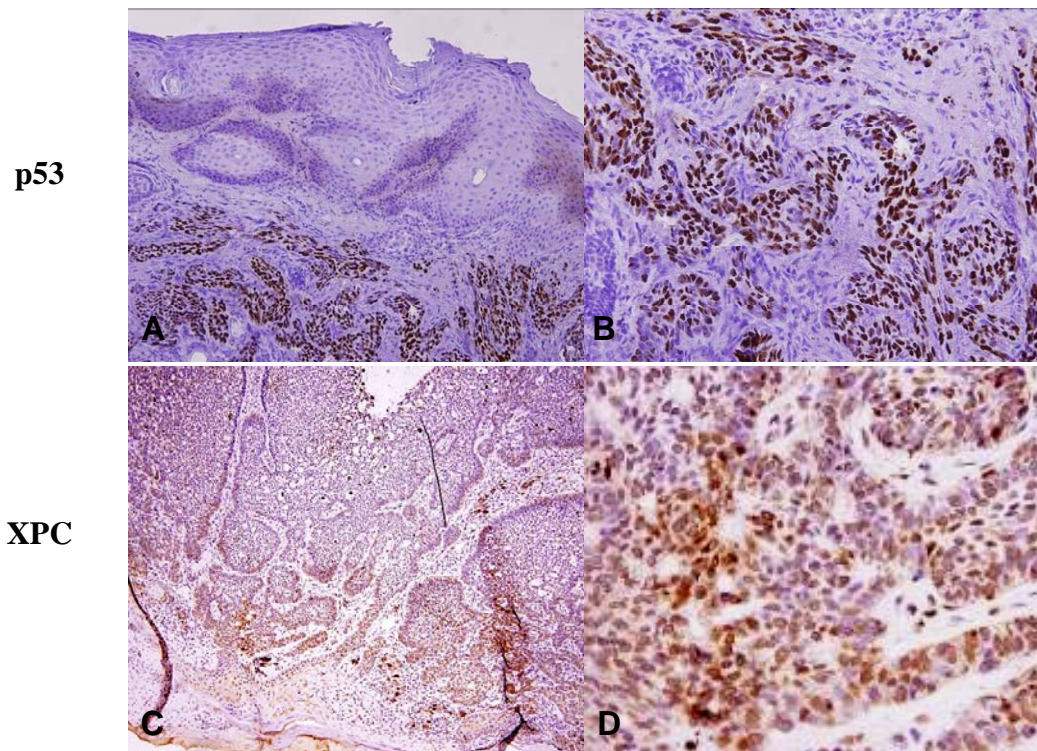


Fig. 2 The immunohistochemical staining of basal cell carcinoma. P53-stained cells mainly distributed mainly over progenitor cells and basaloid cells in BCC (A & B). XPC-stained cells mainly over progenitor cells and basaloid cells in BCC(C & D) (X200)

**Table 1. Immunohistochemical staining of p53 in BCC and SCC**

Specimens	p53 protein		
	Number	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)
Total number	113	76 (67)	37 (33)
SCC	41	28 (68)	13 (32)
BCC	56	34 (61)	22 (39)
Normal skin	16	14 (87)	2 (13)

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

**Table 2. Immunohistochemical staining of XPC in BCC and SCC**

Specimens	XPC protein		
	Number	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)
Total number	113	91 (80)	23 (20)
SCC	41	31 (76)	10 (24)
BCC	56	45 (80)	11 (20)
Normal skin	16	14 (87)	2 (13)

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor



**Table 3. Comparison of p53 staining in SCCs by age and gender**

Clinical characteristic	p53 protein			P value <sup>b</sup>
	Number	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)	
Total number	41	28 (68)	13 (32)	
Age				
≤65	18	15 (83)	3 (17)	0.0955
>65	23	13 (57)	10 (43)	
Gender				
Female	15	9 (60)	6 (40)	0.4917
Male	26	19 (73)	7 (38)	

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

<sup>b</sup> Fisher's Exact Test; p<0.05 is considered statistically significant.

**Table 4. Comparison of p53 staining in BCCs by age and gender**

Clinical characteristic	p53 protein			P value <sup>b</sup>
	Number	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)	
Total number	56	34 (61)	22 (39)	
Age				
≤65	23	14 (61)	9 (39)	1
>65	33	20 (60)	13 (40)	
Gender				
Female	27	15 (57)	12 (43)	0.5851
Male	29	19 (63)	10 (37)	

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

<sup>b</sup> Fisher's Exact Test; p<0.05 is considered statistically significant.

**Table 5. Comparison of XPC staining in SCCs by age and gender**

Clinical characteristic	XPC protein			P value <sup>b</sup>
	Number	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)	
Total number	41	31 (76)	10 (24)	
Age				
≤ 65	18	14 (78)	4 (22)	0.7222
> 65	23	17 (74)	6 (26)	
Gender				
Female	15	12 (80)	3 (20)	0.7197
Male	26	19 (73)	7 (27)	

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

<sup>b</sup> Fisher's Exact Test; p<0.05 is considered statistically significant.

**Table 6. Comparison of XPC staining in BCCs by age and gender**

Clinical characteristic	XPC protein			P value <sup>b</sup>
	Number	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)	
Total number	56	45 (80)	11 (20)	
Age				
≤ 65	23	20 (87)	3 (13)	0.4957
> 65	33	25 (76)	8 (24)	
Gender				
Female	27	21 (78)	6 (22)	0.7425
Male	29	24 (83)	5 (17)	

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

<sup>b</sup> Fisher's Exact Test; p<0.05 is considered statistically significant.

**Table 7. Comparison of p53 staining in BCCs, SCCs and normal skin by intensity**

Specimens	Number	Intensity of p53 expressions			
		+++ n (%)	++ n (%)	+ n (%)	- n (%)
Total number	113	13(11)	35 (31)	47 (42)	18 (16)
SCC	41	5 (12)	17 (41)	13 (33)	6 (14)
BCC	56	8 (14)	14 (25)	22 (40)	12 (21)
Normal skin	16	0 (0)	4 (25)	12 (75)	0 (0)

+++ : dark bronze to brown; ++: bronze; +: faint bronze; - : no staining

**Table 8. Comparison of XPC staining in BCCs, SCCs and normal skin by intensity**

Specimens	Number	Intensity of XPC expression			
		+++ n (%)	++ n (%)	+ n (%)	- n (%)
Total number	113	20 (18)	40 (35)	40 (35)	13 (12)
SCC	41	8 (20)	14 (34)	12 (29)	7 (17)
BCC	56	11 (20)	21 (38)	18 (32)	6 (11)
Normal skin	16	1 (6)	5 (31)	10 (63)	0 (0)

+++ : dark bronze to brown; ++: bronze; +: faint bronze; - : no staining

**Table 9. Comparison of p53 staining of SCCs by pathologic characteristic**

Pathologic type	Proportions of p53 expression		P value <sup>b</sup>
	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)	
Low grade <sup>c</sup>	18 (59)	11 (41)	0.2323
High grade <sup>d</sup>	7 (78)	1 (22)	

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

<sup>b</sup> Fisher's Exact Test; p<0.05 is considered statistically significant.

<sup>c</sup> Low grade indicates tumor grade I and grade II of SCC

<sup>d</sup> High grade indicates tumor grade III and grade IV of SCC

**Table 10. Comparison of XPC staining of SCCs by pathologic characteristic**

Pathologic type	Proportions of XPC expression		P value <sup>b</sup>
	Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)	
Low grade <sup>c</sup>	21 (76)	8 (24)	0.6487
High grade <sup>d</sup>	7 (87)	1 (13)	

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

<sup>b</sup> Fisher's Exact Test; p<0.05 is considered statistically significant.

<sup>c</sup> Low grade indicates tumor grade I and grade II of SCC

<sup>d</sup> High grade indicates tumor grade III and grade IV of SCC

**Table 11. Co-expression of p53 and XPC in SCCs**

		XPC protein	
		Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)
P53 protein	Positive <sup>a</sup> n (%)	23 (56%)	5 (12%)
	Negative n (%)	8 (20%)	5 (12%)

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

**Table 12. Co-expression of p53 and XPC in BCCs**

		XPC protein	
		Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)
P53 protein	Positive <sup>a</sup> n (%)	28 (50%)	6 (11%)
	Negative n (%)	17(30%)	5 (9%)

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor

**Table 13. Co-expression of p53 and XPC in normal skin**

		XPC protein	
		Positive <sup>a</sup> n (%)	Negative n (%)
P53 protein	Positive <sup>a</sup> n (%)	14 (87%)	0 (0%)
	Negative n (%)	0 (0%)	2 (13%)

<sup>a</sup> Positive: > 10% positive-stained cells in the tumor