

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

原發性肺癌與其轉移腫瘤中之人類乳突瘤病毒之同源性研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2314-B-040-027

執行期間：91年11月1日至92年7月31日

計畫主持人：鄭雅文

協同主持人：李輝、陳榮達

計畫參與人員：吳德威、許一丰

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：中山醫學大學醫研所

中華民國 92 年 10 月 25 日

原發性肺癌與其轉移腫瘤中之人類乳突瘤病毒之同源性研究

Human papillomavirus typing analysis in primary lung tumor and its metastatic tumors

計畫編號：NSC 91-2314-B-040-007

執行期限：91 年 11 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

執行單位：中山醫學大學 醫學研究所

主持人：鄭雅文

壹、中文摘要

自民國七十一年以來，肺癌一直是台灣女性的第一大死亡原因，已知抽煙是引起肺癌的主要病因。但是台灣女性肺癌則不到 10% 的患者可歸罪於抽菸，因此其他環境因子可能參與肺癌的形成。

本研究室之過去研究發現肺癌患者之肺腫瘤中，有高達 35.5% 和 41.1% 的人類乳突病毒 16 和 18 型 (human papillomavirus 16/18) 的感染率。同時亦發現肺癌患者之肺腫瘤組織及周邊血液之 HPV 感染有 70% 的一致性。在 *in situ* 雜交試驗中發現 HPV DNA 存在於血液淋巴球中，因此推測肺腫瘤組織中之 HPV DNA 可能來自血液循環。本計劃利用巢疊式 PCR 及 DNA 自動定序方式分析肺腫瘤組織中測得之 HPV 16/18 之 E6、E7 及 L1 的 DNA 序列，並與血液中所測得之 HPV DNA 序列進行比對，結果發現在 10 位肺腫瘤組織及血液均可測到 HPV16 的肺癌患者中有 4 位其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中不同，但序列之差異性小於 2%，因此仍屬於同一亞型。而在 11 位肺腫瘤組織及血液均可測到 HPV18 的肺癌患者中有 5

位其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中不同，僅有一位序列之差異性大於 2%，屬於不同亞型其餘 4 位之序列差異性均小於 2%。因此推測肺腫瘤組織中之 HPV 16 或 18 與血液中之 HPV 可能同源。

本計畫進一步以 *in situ* 雜交技術 (*in situ* hybridization; ISH) 及 DNA 定序分析等方法分析原發性肺腫瘤以及其轉移其他器官之腫瘤組織中之 HPV 感染情形及同源性，結果發現兩者之 HPV DNA 序列具有一致性，並由原位反轉錄聚合酶連鎖反應，分析其 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現，結果發現不論在原發性肺腫瘤或其轉移至其他器官之腫瘤組織中均可測到 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現，兩者具有一致性。綜合以上結果，我們推測肺腫瘤組織中之 HPV 可能來自血液循環且 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現可能會增強肺腫瘤轉移之能力。

關鍵字：肺癌，人類乳突瘤病毒

ABSTRACT

Lung cancer is the leading and second cause of cancer death in female

since 1982 in Taiwan. Intriguingly, only around 10% of female lung cancer incidence in Taiwan, was related to cigarette smoking. Thus, it is conceivable that environmental factors other than cigarette smoking may be associated with lung cancer development in Taiwan.

The high prevalence of HPV 16/18 infections in Taiwanese lung cancer patients was reported in our recent study. Additionally, there is an approximately 70% concordance between HPV DNA detection in peripheral blood cells and lung tumor tissues of lung cancer patients. Our preliminary *in situ* hybridization data showed the peripheral blood leukocytes to possess HPV DNA signal. Thus, in this study, we hypothesize that HPV DNA in lung tumors may be transmitted from leukocytes in blood circulation. Nested-PCR and autosequencing were used to compare the sequence variant in L1, E6 and E7 of HPV 16/18 in lung tumors and that of leukocytes in blood circulation. Sequence variants were found in 4 of 10 lung cancer patients with present the HPV16 signal both in tumor tissues and blood circulation, but the variant were <2% and classified the same subtype. Sequence variants were also found in 5 of 11 lung cancer patients with present the HPV18 signal both in tumor tissues and blood circulation, only 1 of 5 were >2%. Thus we suggested that the HPV 16/18 infection in lung tumor tissues may originate from blood circulation.

To elucidate the HPV infection was involved in lung tumorigenesis, HPV DNA including L1, E6, E7 in the metastatic tumors in other organs and their primary lung tumors were detected by

in situ hybridization. The DNA sequence of L1, E6, and E7 in lung tumors and metastatic tumors also analyzed and compared to understand whether HPV is the same typing. HPV16/18 E7/E7 mRNA were also detected by *in situ* RT-PCR and their relationships with clinical parameters were statistically analyzed to evaluate whether HPV has an impact on the metastatic ability of the lung tumor cells will be induced by HPV. *In situ* hybridization data were observed the primary lung tumors and their metastatic tumors were co-infections by HPV and the HPV sequences were not different. These results suggest that HPV 16/18 infection in lung tumor may be originate from blood circulation and may be involved in lung tumorigenesis.

Key words: lung cancer, Human papillomavirus

貳、緣由與目的

根據行政院衛生署統計資料顯示，自 1982 年以來，惡性腫瘤就高居台灣民眾十大死因之首，而肺癌則分別位居男、女性之第二位和第一位之癌症死因。已知抽菸是引起肺癌的主要原因，而所有癌症的死亡原因也約有 30-40% 可以抽菸來解釋 (Lobe et al., 1984)，但流行病學的研究指出，中國婦女抽菸人口的比例低於其他種族，但肺癌盛行率卻逐年升高 (Deng and Gao et al., 1985)。同時發現中國女性肺癌之細胞型態，大多屬肺腺癌 (MacLennan et al., 1977; Kung et al., 1984; Gao et al., 1987)。近年來台灣地區由於抽菸量降低，與抽菸相關性最高之鱗狀上皮細胞肺癌有逐年下降的趨勢，但是肺腺癌之發病率卻

逐年增加 (Department of Health, ROC, 1984 - 2000)，因此其他環境因子是否參與其肺癌的形成，將是重要之研究課題。

過去本研究室以巢疊式 PCR (nested PCR) 及原位雜交試驗 (In situ hybridization; ISH) 分析發現高危險型人類乳突瘤病毒 16 及 18 型在肺癌患者肺腫瘤組織中的感染率分別為 35.5% 及 41.1%，遠高於非癌症患者 (HPV16: 15.0%, HPV18: 11.7%) (Cheng et al., 2001)。因此推測 HPV 16/18 感染可能參與台灣肺癌形成或加速肺癌之惡化。

目前有關 HPV 與人類癌症形成之研究，大多來自於子宮頸癌方面的研究。90% 的子宮頸癌患者有 HPV 的感染，尤其是高危險型之 HPV (Zur Hausen, 1991)。此外，頭頸部癌症、膀胱癌、食道癌、支氣管癌及肺癌之腫瘤組織中也都發現有 HPV 的感染 (Viola et al., 2001; Haled et al., 2001; Serraino et al., 2001)，但這些癌症的形成與 HPV 之間的相關性仍有待釐清。有關肺癌與 HPV 感染相關性之研究已有一些國家報告過。例如美國 (Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992)，日本 (Szabo et al., 1995; Hirayasu et al., 1996)、芬蘭 (Nouva et al., 1995; Soini et al., 1996)、挪威 (Henning et al., 1999)、法國 (Thomas et al., 1995) 及中國大陸 (de Villiers et al., 1996) 等。他們報告之感染率由 0 - 80% 不等，在美國及法國等國家的報告均指出在肺組織中的 HPV 感染率相當低，甚至測不到 (Bohlmeier et al., 1998; Yousem et al., 1992; Thomas et al., 1995)。但在日本琉球卻有高達 80% 的感染率 (Iwamasa et al., 2000)，在中國大陸的感染率亦高達 50% (de Villiers et al., 1996)。由以上之結果得知，HPV 的感染與肺癌之相

關性，似乎有人種和地域的關係，因此探討 HPV 感染是否參與台灣肺癌之肺腫瘤形成，是值得重視的研究課題。

過去許多流行病學的研究均指出，高危險型 HPV 是藉由性行為傳染 (Thomas et al., 2001; Kjaer et al., 2001; Buchanan et al., 2001)。Richardson et al. (2000) 分析高危險型及低危險型 HPV 在學生族群之感染途徑時發現，高危險型 HPV 之感染與性行為有關，但低危險型 HPV 卻沒有相關。HPV 感染除了和子宮頸癌有關之外，HPV 亦和其他許多人類癌症有關。例如頭頸癌、喉癌、食道癌和結直腸癌等。頭頸癌患者的非腫瘤組織中 HPV 的感染率在 18.5-35.9%，但在腫瘤組織中之感染率則可達 34.5%，高危險型 HPV 16/18 頭頸癌之感染率分別為 40.0% 和 11.9%。在所有頭頸癌中，以口腔癌患者之 HPV 感染率最高，可高達 59.0%，其次是咽頭癌 43.0%，而喉癌則較低，僅有 33.0%。在正常人之口腔中 HPV 的感染率由 1 - 60% 不等 (Mckaig et al., 1998)。因此肺腫瘤組織中之 HPV 有可能來自於口腔或呼吸道之感染。另外，Olatunbosun et al. (2001) 的研究發現，曾經或現在正感染 HPV 者有 53% (24/45) 可在其精子中測到 HPV DNA 的存在，而沒有感染 HPV 之控制組之精子中 HPV 的感染率也有 8%。美國的一個研究發現未滿 20 歲的孩童口腔黏膜細胞中 HPV 的感染會因年齡不同而有不同，年齡小於 7 歲之孩童的感染率為 8.7%，7-13 歲的孩童感染率為 0%，而 13-20 歲則有 5.2% 的感染率。而這些 HPV 的感染與性別、種族都沒有相關。又發現 13-20 歲之青少年族群中 HPV 的感染率與抽菸及性行為亦無相關。因此青少年之 HPV 可能來自在生產過程中由母親感染給嬰兒的垂直性感染途徑 (Summersgill et al.

2001)。

本研究室利用正常人及肺癌患者之周邊淋巴球進行 HPV 16 及 HPV 18 的分析，結果除了肺癌患者外，健康之正常人的周邊白血球中亦可測到 HPV DNA 的存在。在肺癌患者之周邊白血球中可測到 HPV DNA 的存在，其感染率分別為 HPV 16：47.4%，HPV 18：32.12% (n=137)。又發現同時可在肺腫瘤組織及周邊血液中測到 HPV DNA 之比例亦高達 70% (Chiou et al., 2003)。因此推測肺癌患者腫瘤組織中的 HPV 16/18，可能來自性行為、垂直感染或口腔及呼吸道之感染，而藉由血液感染到肺臟，然而此推測仍需進一步之實驗證明。

已知人類乳突瘤病毒之分類標準是依據 E6、E7 及 L1 的 DNA 序列之不同而區分出不同型及不同亞型之 HPV，當 E6、E7 及 L1 之 DNA 序列差異大於 10%，則為不同型 (type)，DNA 序列差異在 2-10% 之間，則稱為次型 (subtype)；DNA 序列差異小於 2%，則稱為變異種 (variant) (van Ranst et al., 1993)。為確定肺腫瘤組織中感染之 HPV 與周邊血液中之 HPV 是屬於同源之 HPV，本計劃擬分析肺腫瘤組織中測得之 HPV 16/18 之 E6、E7 及 L1 的 DNA 序列並與血液中所測得之 HPV DNA 序列進行分析比較，以了解周邊血液及肺腫瘤組織中之 HPV 是否同源？以進一步了解肺腫瘤組織中 HPV 的可能感染途徑。

為了進一步證明 HPV 感染確實參與了肺癌的腫瘤化，本計劃將收集肺腫瘤以及被轉移之其他器官之腫瘤組織，以原位雜交技術 (in situ hybridization; ISH) 及 DNA 定序分析等方法，探討肺腫瘤以及轉移器官腫瘤之腫瘤及血球細胞中之 HPV 16/18 的感染是否同源？並以原位反轉錄

聚合酶連鎖反應，分析 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現，以了解 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 的表現是否與 HPV 轉移至轉移器官之能力有關？此研究結果將有助於了解 HPV 是否會增強肺腫瘤轉移之能力，同時亦可證明 HPV 確實存在於肺腫瘤組織中。本研究 ISH 之分析結果，將由病理醫師詳細觀察腫瘤組織周圍之血球細胞與腫瘤組織之 HPV 感染是否有一致性？本計劃之研究成果，將有助於進一步確定 HPV 感染與肺癌之相關性，同時又能獲知肺組織中 HPV 經由血液循環而感染之可能性。

參、結果

本研究共收集 77 位肺癌患者包含 31 位女性及 46 位男性，其餘有關各臨床因子之分佈情形包括腫瘤形式、期別、抽煙習慣及平均年齡等資料列於 Table 1。並利用 nested-PCR 偵測這 77 位肺癌患者血球及肺腫瘤組織中 HPV 16/18 感染情形。結果發現 77 位肺癌患者血球中 HPV 16 及 HPV 18 感染率分別為 22.1% (17 of 77) 及 28.6% (22 of 77)，77 位肺癌患者肺腫瘤組織中 HPV 16 及 HPV 18 感染率分別為 36.4% (28 of 77) 及 24.7% (19 of 77)。進一步分析血球與肺腫瘤組織之 HPV 16/18 感染的相關性時發現，在 17 位血球中有 HPV 16 感染的肺癌患者有 58.8% (10 of 17) 在肺腫瘤組織中可測到 HPV 16 DNA，而 60 位血球中沒有 HPV 16 感染的肺癌患者有 70.0% (42 of 60) 在肺腫瘤組織中未感染 HPV 16。因此共有 67.5% (52 of 77) 的肺癌患者其血球及肺組織之 HPV 16 感染具有一致性，具有統計上的意義 (P=0.042, Table 2)。22 位血球中 HPV 18 感染的肺癌患者有 50.0% (11 of 22) 在肺腫瘤組織中可偵測到，而 55 位血球中

沒有 HPV 18 感染的肺癌患者有 85.5% (47 of 55)，在肺腫瘤組織中未感染 HPV 18。統計結果發現，有 75.3% (58 of 77) 的肺癌患者之 HPV 18 感染在血球及肺腫瘤組織之 HPV 感染具有一致性，具有統計上的意義 ($P = 0.003$, Table 2)。由以上結果推測 HPV 16 及 18 有可能經由血球感染至肺臟。

為證明腫瘤組織與血液中之 HPV 的同源性，本研究進一步利用 DNA 自動定序儀分析肺腫瘤組織中測得之 HPV 16/18 之 E6、E7 及 L1 的 DNA 序列，並與血液中所測得之 HPV DNA 序列進行比對，結果發現在 10 位肺腫瘤組織及血液均可測到 HPV16 的肺癌患者中有 4 位其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中不同，但序列之差異性小於 2%，因此仍屬於同一亞型。而在 11 位肺腫瘤組織及血液均可測到 HPV18 的肺癌患者中有 5 位其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中不同，僅有一位序列之差異性大於 2%，屬於不同亞型其餘 4 位之序列差異性均小於 2%。因此推測肺腫瘤組織中之 HPV 16 或 18 與血液中之 HPV 可能同源。

為了進一步證明 HPV 感染與肺腫瘤細胞轉移之相關性，本計劃共收集 11 對原發性肺腫瘤以及其轉移其他器官之腫瘤組織，以原位雜交技術 (in situ hybridization; ISH) 及 DNA 定序分析分析肺腫瘤以及轉移器官腫瘤以及血球細胞中之 HPV 16/18 感染的一致性。在以 ISH 的分析結果中發現 11 位肺癌患者中有 4 位可在其肺腫瘤組織中測到 HPV16 DNA 的感染，而其轉移之腫瘤組織中僅 2 位可測到 HPV 16 DNA，為進一步了解 HPV 16 E6 及 E7 對肺腫瘤細胞轉移能力之影響，本計畫亦以 *In situ* RT-PCR 方法分析

肺癌及其轉移其他器官之腫瘤組織中 HPV 16 E6/E7 mRNA 的表現，結果發現 4 位可在其肺腫瘤組織中測到 HPV16 DNA 感染的肺癌患者中 2 位可在其腫瘤組織中測到 HPV 16 E6/E7 mRNA 而另外兩位則僅能測到 HPV 16 E7 mRNA (Fig.1)，而在其轉移至其他器官之腫瘤組織中亦發現當期肺腫瘤組織中可測到 HPV 16 E6/E7 mRNA 時其轉移之腫瘤組織亦可測到 HPV16 DNA 且可表現 HPV 16 E6/E7 mRNA，但若肺腫瘤組織中僅測到 HPV 16 E7 mRNA 時其轉移之腫瘤組織中則測不到 HPV 16 DNA 的感染。而在 HPV18 的情形也一樣 (Table 3)。為了證明肺腫瘤組織中之 HPV 與其轉移至其他器官之腫瘤組織中之 DNA 同源，本計畫亦利用 DNA 定序分析其 HPV DNA 序列，結果兩者之序列一致，因此由以上結果我們推斷 HPV 可經由腫瘤細胞之轉移而至其他器官，且 HPV 16/18 之 E6 的表現與否和 HPV 轉移至轉移器官之能力有關。

綜合以上結果，我們推測肺腫瘤組織中之 HPV 可能來自於血液循環，且 HPV 16/18 之 E6 的表現與否和 HPV 轉移至轉移器官之能力有關。

肆、討論

本研究所選取的檢體為血液檢體，可分成血清、血漿及血球細胞來分析。目前利用血液檢體來偵測 HPV 感染的研究，大多是偵測血清中的 HPV 抗體，而 HPV DNA 在子宮頸癌 (20%) 及頭頸癌 (0%) 病患的血清中偵測到比例極低 (Liu et al., 2001; Capone et al., 2000)。Dong et al., (2002) 研究顯示無論子宮頸癌病患 (6.9%) 或健康成人 (1.7%) 的血漿中都可偵

測到少量的 HPV E7 DNA。與血清中的抗體偵測率相較之下，在血清及血漿中的 HPV DNA 偵測比例卻相對較低，推測可能是只能偵測到因細胞發生壞疽 (necrosis) 或凋亡 (apoptosis) 而游離於細胞外的 HPV。而在先前研究發現，同時偵測子宮頸癌病患其子宮頸細胞、血球及血清中 HPV DNA，子宮頸細胞 (100%) 的檢出率比血球 (52.0%) 及血清 (8%) 來的高，但血球的 HPV 檢出率比血清高 (Pao et al., 1991)。而本研究同樣發現血球與肺腫瘤組織中之 HPV 的感染有 70% 的一致性。因此早期偵測血球中是否有 HPV 感染，或許可做為肺癌之早期診斷的輔助指標，在臨床上或許能協助肺癌的早期診斷。

Hennig et al. (1999) 分析 75 位支氣管肺癌患者肺腫瘤組織中 HPV DNA 的感染情形，發現感染率可高達 49% (37/75)，而 37 位有 HPV 感染之肺癌患者中，有 34 位有子宮頸病變的病史，且其子宮頸 HPV 感染率為 74% (25/34)，因此推測支氣管肺癌患者肺腫瘤組織中的 HPV 可能來自於子宮頸的感染，而藉由血液循環到肺臟。挪威及日本的研究有高 HPV 感染率之發現，肺腫瘤組織中可以測到 HPV DNA 者有 80% 患者有子宮頸病變的病史 (Hennig et al., 1999; Iwamasa et al., 2000)，因此這兩個國家之肺腫瘤組織中的 HPV，很可能來自子宮頸感染，然後經血液循環感染至肺部。由 Kjaer 等人 (2001) 的研究發現，97 位未發生性行為的女性其子宮頸 HPV 感染率為 1.5%，經兩年後，有 67 位女性發生過性行為，其子宮頸 HPV 感染率提高至 35.4%。過去許多流行病學的研究均指出，高危險型 HPV 是藉由性行為傳染 (Thomas et al., 2001; Kjaer et al., 2001; Buchanan et al., 2001)。另外，有研究分析高危險型及低危險型 HPV 在學生族群之感染途徑時發現，高危險型之 HPV 之感染

與性行為有關，但低危險型則無關。Thomas 等人 (2001) 發現從事性工作之女性，有較高之高危險型 HPV 感染率。Olatunbosun 等人 (2001) 發現曾經或現在正感染 HPV 者有 53% (24/45) 可在其精子中測到 HPV DNA 的存在，而沒有感染 HPV 之控制組之精子中 HPV 的感染率僅有 8%。因此男性可能藉由性行為將 HPV 感染給女性。由於本研究之肺癌患者全部是已婚者，且經由 DNA 定序之結果亦發現肺腫瘤組織及血液中之 HPV 序列一致，因此推測台灣女性肺癌患者之子宮頸感染高危險型 HPV 16/18 可能主要經由性行為感染，而散播至血液，繼而經血球藉血液循環感染肺臟組織。

而最近 Huang (1999) 等人的研究發現在子宮頸癌所轉移而產生腫瘤的小腦及大腦組織中亦可偵測到 HPV 16/18 DNA 的存在，而在原發性之腦部腫瘤則從未有相關研究指出可在其腫瘤細胞測到 HPV DNA 的存在，因此作者進一步利用 DNA 定序分析後確認子宮頸及小腦兩者之腫瘤組織中所感染之 HPV 16/18 序列完全相同，且進一步經由分析其淋巴結中之 HPV 的感染情形發現小腦及大腦之腫瘤組織中之 HPV 16/18 可能來自於子宮頸之癌細胞經由淋巴結轉移而至小腦及大腦。而在子宮頸癌細胞所轉移而產生陰道癌或許多淋巴結中均可得到相同的結果 (Lewandowski et al., 1990; Griardi et al., 1993; Mvula et al., 1994)。本計畫之研究結果亦發現肺腫瘤組織中之 HPV 與其轉移至其他器官之腫瘤組織中之 DNA 同源，且 HPV 16/18 之 E6 的表現與否和 HPV 轉移至轉移器官之能力有關。

伍、參考文獻

Bohlmeier T, Le TN, Shroyer AL, Markham

- N, and Shroyer KR. Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction. *Am. J. Respir. Cell & Mol. Bio.*, 18(2): 265-9, 1998.
- Buchanan J. and Niel-Fisher NS. Role of immune function in human papillomavirus infection. *JAMA*, 286(10):1173-4, 2001.
- Capone, RB, Pai, SI, Koch, WM, Gillison, ML, Danish, HN, Westra, WH, Daniel, R, Shah, KV, and Sidransky, D. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 6:4171-4175, 2001.
- Cheng Y-W, Chiou H-L, Sheu G-T, Hsieh L-L, Chen J-T, Chen C-Y, Su J-M, Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res*, 61:2799-2803, 2001.
- de Villiers EM. Hybridization methods other than PCR: an update. IARC Scientific Publications (Lyon). (119):111-9, 1992.
- Deng J. The prevalence of the cigarette smoking habit among 110,000 adult residents in the Shanghai urban area. *Chung-Hua Yu Fang i Hsueh Tsa Chih* 19(5):271-4, 1985.
- Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, Mortel R, McGowan L, Greenberg MD, Barnes WA, Sidransky D. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11:3-6, 2002.
- Gao YT, Blot WJ, Zheng W, Ershow AG, Hsu CW, Levin LI, Zhang R, and Fraumeni Jr JF. Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer*, 40:604-609, 1987.
- Girardi F, Pickel H, Beyer-Finkler E, Pfister H. Specific rearrangements of human papillomavirus DNA provide molecular evidence for genetic heterogeneity of primary cervical cancers, recurrences, and lymph node metastases in two patients. *Gynecol Oncol*, 51, 281-6, 1993.
- Hennig EM, Suo Z, Karlsen F, Holm R, Thoresen S, and Nesland JM. HPV positive bronchopulmonary carcinomas in women with previous high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Acta. Oncologica.*, 38(5):639-47, 1999.
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, and Genka K. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J. Clin. Pathol.*, 49(10):810-7, 1996.
- Iwamasa T, Miyagi J, Tsuchiko K, Kinjo T, Kamada Y, Hirayasu T, and Genka K. Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Pathol. Res. Practice*, 196(4):209-18, 2000.
- Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, and Meijer CL. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10(2):101-6, 2001.

- Kung IT, So KF, Lam TH. Lung cancer in Hong Kong Chinese: mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer*, 50(3):381-8, 1984.
- Lewandowski G, Delgado G, Holloway RW, Farrell M, Jenson AB, Lancaster WD. The use of in situ hybridization to show human papillomavirus deoxyribonucleic acid in metastatic cancer cells within lymph nodes. *Am J Obstet Gynecol*, 163, 1333-7, 1990.
- Liu, VW, Tsang, P, Yip, A, Ng, TY, Wong, LC, and Ngan, HY. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 82:269-272, 2001.
- MacLennan R, da Costa J, Day NE, Law CH, Ng YK, and Shanmugaratnam K. Risk factors for lung cancer in Singapore Chinese, a popula
- Mvula M, Iwasaka T, Matsuo N, Nakao Y, Kaku T, Hachisuga T, Fukuda K, Tsukamoto N, Sugimori H. Detection of human papillomavirus type 16 and 18 primary and in metastatic lesions of cervical carcinomas. *Gynecol Oncol*, 53, 156-60, 1994.
- Nourva K, Soini Y, Kamel D, Pollanen R, Bloigu R, Vahakanogas K, Paakko P. p53 protein accumulation and the presence of human papillomavirus DNA in bronchiolo-alveolar carcinoma correlate with poor prognosis. *Int. J. cancer*, 64(6), 424-429, 1995.
- Olatunbosun O, Deneer H, and Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstetrics & Gynecol.*, 97(3):357-60, 2001.
- Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol*, 15: 1008-1012, 1997.
- Richardson H, Franco E, Pintos J, Bergeron J, Arella M, and Tellier P. Determinants of low-risk and high-risk cervical human papillomavirus infections in Montreal University students. *Sexually Transmitted Diseases*, 27(2):79-86, 2000.
- Serraino D, Piselli P, and Scognamiglio P. Viral infections and cancer: epidemiological aspects. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 15 (3):224-228, 2001.
- Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pollanen R, Vahakanogas K, Lehto VP, Paakko P. Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma less comments. *Thorax*, 51(9): 878-879, 1996.
- Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, and Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontics*, 91(1):62-9, 2001.
- Szabo I, Sepp R, Nakamoto K, Maeda M, Sakamoto H, Uda H. Human papillomavirus not found in squamous and large cell lung carcinomas by polymerase chain reaction. *Cancer*, 73 (11):2740-2744, 1994.

Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Douagui H, and Kleisbauer JP. Detection of human papillomavirus DNA in primary lung carcinoma by nested polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.*, 41(8):1093-7, 1995.

Thomas DB, Ray RM, Kuypers J, Kiviat N, Koetsawang A, Ashley RL, Qin Q, and Koetsawang S. Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. III. The role of husbands and commercial sex workers. *Am. J. Epidemiol.*, 153(8):740-8, 2001.

Yousem SA, Ohori NP, Sonmez-Alpan E. Occurance of human papillomavirus DNA in primary lung neoplasmas. *Cancer*, 69 (3):693-697, 1992.

Zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*, 184 (1): 9-13, 1991.

Table 1. The characteristics of study subjects in this study.

Parameters	N	%
Age (mean±SD)	65.52±10.25	-
Gender		
Female	31	40.3
Male	46	59.7
Smoking status		
Non-smoking	33	42.8
Smoking	34	44.2
Unknow	10	13.0
Tumor type		
Adenocarcinoma	41	53.2
Squamous cell carcinoma	36	46.8
Tumor stage		
I	30	40.0
II	17	20.0
III	30	40.0
T factor		
1	0	0
2	61	79.2
3	14	18.2
4	2	2.6
N factor		
0	37	48.1
1	16	20.8
2	20	26.0
3	2	5.1
M factor		
0	77	100
1	0	0

Table 2. Correlation of the HPV infection between peripheral blood and tumor tissue in lung cancer patients.

Tissue	Blood		p value
	Negative	Positive	
HPV16	(n=60)	(n=17)	
Negative	42	7	
Positive	18	10	0.045
HPV18	(n=55)	(n=22)	
Negative	47	11	
Positive	8	11	0.003

Table 3. HPV 16/18 DNA, E6 and E7 mRNA detection in primary lung tumors and their metastatic tumors

Patient no. (Site of metastasis organ)	Lung tumor						Metastatic tumor					
	HPV16			HPV18			HPV16			HPV18		
	DNA	E6	E7	DNA	E6	E7	DNA	E6	E7	DNA	E6	E7
1 (brain)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 (soft tissues)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 (adrenal gland)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 (cerebellum)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 (brain)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 (bone)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 (brain)	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8 (brain)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 (brain)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 (brain)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 (brain)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

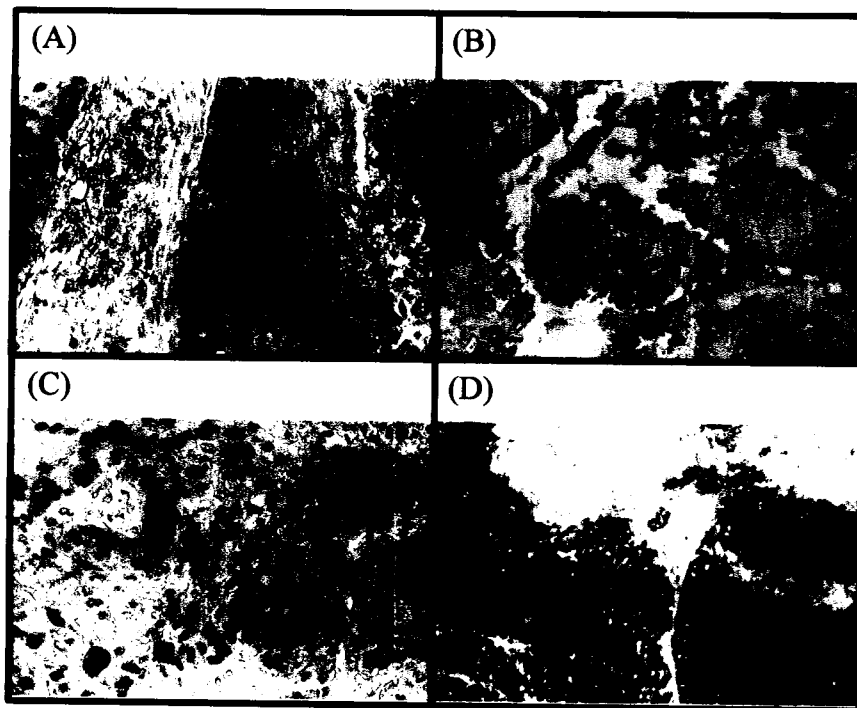


Fig.1. HPV 16/18 DNA detection in primary lung tumors and their metastatic tumors analyzed by ISH. (A) lung tumor, (B) metastatic brain tumor, (C) lung tumor and (D) metastatic cerebellum.