

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

以台灣肺癌患者胸水中建立出之HPV 16 感染之肺腺癌細胞株探討HPV16 E6 在肺癌p16 基因甲基化作用機轉

Study of HPV 16 E6 in p16 gene promoter hypermethylation in
Tainwase lung cancer cell culture from pleuraleffusion

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：96-2314-B-040-026-

執行期間：96年8月1日至97年7月31日

計畫主持人：吳銘芳

共同主持人：李輝、鄭雅文

計畫參與人員：楊宛蓉

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

中 華 民 國 年 月 日

附件二

可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱：以台灣肺癌患者胸水中建立出之HPV 16 感染之肺腺癌細胞株探討HPV16 E6 在肺癌p16 基因甲基化作用機轉 計畫主持人：吳銘芳 計畫編號：NSC 96-2314-B-040-026- 學門領域：生物生化
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：
可利用之產業 及 可開發之產品	

技術特點	
推廣及運用的價值	

- ※ 1.每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2.本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3.本表若不敷使用，請自行影印使用。

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以台灣肺癌患者胸水中建立出之HPV 16 感染之肺腺癌細胞株探討HPV16 E6 在肺癌p16 基因甲基化作用機轉

Study of HPV 16 E6 in p16 gene promoter hypermethylation in Tainewase lung cancer cell culture from pleuraleffusion

計畫編號：NSC 96-2314-B-040-026-

執行期限：96 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

主持人：吳銘芳

中山醫學大學 醫學系

中文摘要：

最近研究指出，致癌病毒感染宿主細胞，會經由使宿主細胞抑癌基因甲基化，而導致細胞的腫瘤化，但其作用機轉仍不清楚。已知高危險型HPV 所轉錄產生的致癌蛋白E6 可經由降解p53 抑癌蛋白而促使細胞的腫瘤化，亦有研究指出p53 抑癌蛋白可抑制DNMT 轉錄起始區的轉錄活性進而抑制DNMT 蛋白的表現，因此推測HPV 可能藉由E6 蛋白使p53 蛋白去活化而無法抑制DNMT 的轉錄，進而促使抑癌基因p16 的甲基化。但在子宮頸癌的研究發現，HPV 16/18 E7 會與HDAC 交互作用，而使HDAC 維持DNA 雙股結構之能力失效，使E2F 啟動有關細胞增生之基因轉錄活化。這顯示HPV 16/18 E6 及E7 致癌蛋白在肺癌細胞及子宮頸癌細胞株的甲基化調控機制以及致癌機轉有所不同。除p53 外，DNMT3b 轉錄起始區的基因多型性亦影響其基因的轉錄調控，且HPV16 致癌蛋白E6 是否會直接調控DNMT3b 的表現則仍不清楚，因此本計畫擬構築不同基因型之DNMT3b 轉錄起始區轉染至肺腺癌細胞株 A549，利用 report assay 及 Chromatin immunoprecipitation assay (CHIP) 方式分析釐清HPV E6 致癌蛋白是經由抑

制p53 而活化DNMT3b，或是可直接經由與 DNMT3b 轉錄起始區結合而活化 DNMT 的表現，並釐清HPV 對不同基因型之DNMT3b 的轉錄活性是否有影響，此外亦利用MS-PCR 及同步定量反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)分別偵測 p16基因的甲基化及其mRNA 表現，以證明HPV 確實經由影響DNMT3b 造成p16 基因甲基化影響p16 抑癌基因表現而使細胞腫瘤化。

Key words: lung cancer, p16, HPV16 E6, DNMT3b

英文摘要

Frequent promoter hypermethylation of tumor suppressor genes (TSGs), such as p16, RASSF1A, and ER, was frequently observed in oncogenic virus-induced human cancers. However, the underline mechanism is still unclear. TSGs transcription was regulated by the balance of acetylation and deacetylation of histone through histone acetylase (HAT) and histone deacetylase (HDAC), respectively. In cervical cancer, HPV 16/18 E7 can be interacted with HDAC to open DNA strand for E2F binding and then upregulates cell

proliferation-associated gene expressions. Our preliminary data showed that HDAC expression was increased in lung cancer cells after transfected with HPV 16 E6, E7, respectively, and the hypermethylation frequency of p16 and RASSF1A was concomitantly increased in HPV-transfected lung cancer cells as compared with parental cells. Moreover, the expression levels of DNMT1 and DNMT3b in cervical cancers were significantly lower than those of lung tumors with HPV infection (unpublished data). This result was consistent with fewer p16 hypermethylation in cervical cancer compared to lung cancer. Based on the above mentions, HPV infections in lung cancer and cervical cancer had a different role in p16 inactivation. Beside p53, DNMT3b promoter polymorphism will also affect on p16 transcriptional regulation, and whether HPV16 E6 oncoprotein can regulate DNMT3b expression directly or not is still unclear. Therefore, we propose to construct different genomic types of DNMT3b promoters and transfect them into lung adenocarcinoma cells A549, by using report assay and Chromatin immunoprecipitation assay (CHIP) to illuminate whether HPV E6 oncoprotein is through the inhibition of p53 and further activation of DNMT3b, or through binding with DNMT3b promoter directly to activate DNMT expression, also to clarify whether HPV will affect the regulatory activity of different genomic types of DNMT3b promoters or not. Meanwhile, p16 hypermethylation and its mRNA expression will be examined by MS-PCR and real-time RT-PCR, respectively, to prove

that HPV is through DNMT3b upregulation and then causes p16 hypermethylation and tumorigenesis.

緒言:

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，歐美國家的肺癌有90%以上可用抽菸來解釋(Loeb et al, 1984)。但是台灣地區則有一半的肺癌無法以抽菸來說明，尤其台灣女性肺癌患者有90%以上是不抽菸者。且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，雖然香菸是引起肺癌的最主要因子。但在台灣可能有其他的環境因子參與不抽菸者之肺癌的形成。

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。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。當校正年齡、性別和抽煙之影響後，發現有HPV 16感染者之罹患肺癌之危險性是沒有感染者的6.5倍 (95%CI, 3.7-11.3, $P < .0001$)。而HPV 18則有9.2倍 (95% CI, 4.2-20.2, $P < 0.0001$)。若HPV 16/18同時感染者則其危險性更高達75.7倍 (95%CI, 9.8-582.1, $P < 0.0001$)。因此推測在血液中有HPV 16/18 DNA可做為罹患肺癌之可靠危險指標

(Chiou et al, 2003)。目前有關HPV 與人類癌症形成之研究，大多來自於子宮頸癌方面的研究。因為有 90% 的子宮頸癌患者有 HPV 的感染，尤其是高危險型之 HPV (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(Hirayasu et al, 1996; Szabo et al, 1994)、芬蘭 (Nuorva et al, 1995; Soini et al, 1996)、挪威(Hennig et al, 1999)、法國(Thomas et al, 1995)及中國大陸(de Villiers, 1992)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);(Thomas et al, 1995; Yousem et al, 1992)。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, 1992)。而在過去的研究中發現，肺鱗狀上皮細胞癌患者有高達 79% HPV 的感染 (Hirayasu et al, 1996)。亦有研究指出肺腺癌及肺鱗狀上皮細胞癌均可測到 HPV 的感染，且其感染率亦相當接近，肺腺癌有9%，而肺鱗狀上皮細胞癌有10% (Kinoshita et al.,1995)。Thomas et al. (1998) 的研究發現，在鱗狀上皮癌及腺細胞癌混合的肺癌患者，HPV 的感染率竟高達 78.3%，且在肺腺癌細胞及其鄰近鱗狀上皮癌細胞均可測到 HPV。由以上之結果得知，HPV 的感染與肺癌之相關性，似乎有人種和地域的關係，因此探討 HPV 感染是否參與台灣肺癌之肺腫瘤形成，如何參與是值得重視的研究課題。

目前已知人類乳突瘤病毒主要是藉由轉譯出 E6 及 E7 致癌蛋白，使 p53 及 Rb 蛋白失去功能進而使細胞腫瘤化。而本研究室過去之研究利用連續病理切片以 *in situ* RT-PCR 及免疫組織化學染色法分析 HPV 16/18 E6/E7 mRNA 及 p53/Rb 蛋白在肺腫瘤組織的表現，結果發現肺腫瘤組織中 E6/E7 mRNA 表現者，有 80% 測不到 p53 和 Rb 蛋白的表現，且 HPV 16 E6/E7 表現而 p53/Rb 不表現之肺癌患者之預後也明顯較差 (Cheng et al. submitted)。因此推測 HPV 16/18 可能透過 E6/E7 致癌蛋白去活化 p53 和 Rb 蛋白之致癌路徑參與肺癌形成。此外，本研究室初步利用免疫組織化學染色分析肺腫瘤組織切片中是否可測到 HPV 致癌蛋白的存在，結果在可測得 HPV DNA 的肺癌患者中約有 1/4 的患者可測到 HPV 16/18 E6，在與先前 *in situ* RT-PCR 的結果做比較，在可測得 HPV E6 mRNA 之肺腫瘤組織中約有 50% 可測得其蛋白表現。在肺腫瘤組織中可測得 HPV 致癌蛋白為 HPV 參與肺癌之可能性提供更有利的證據。HPV 除了透過影響 p53 和 Rb 蛋白使其降解或失去活性而造成細胞癌化，在肺腫瘤組織中亦發現會藉由嵌入宿主 DNA 中造成宿主細胞基因的不穩定，如 FHIT 基因而造成細胞癌化 (Wang et al., 2005)。此外，本研究室最近的研究結果也發現抽煙患者與不抽煙之女性患者都有高頻率之 p16 基因之甲基化，已知抽煙會引起 p16 基因甲基化 (Divine et al, 2005; Marsit et al, 2005)。本計劃之執行結果將有助於了解 HPV 16 致癌蛋白 E6 對甲基化路徑調控的影響。

實驗步驟:

(1) 構築不同基因型之 DNMT3b 轉錄起始區轉染至肺癌細胞株 A549:

利用 PCR 反應合成不同基因型之 DNMT3b 的轉錄起始區，將此片段純化後與 vector(stable or inducible)進行 ligation。將 ligation 完後的產物送入 XL-10 competent cells，培養後萃取載體 DNA，以 DNA 定序儀確認接入基因之方向性及序列之正確性。

(2) HPV16 E6 gene轉染至肺癌細胞株

A549:

將帶有 HPV16E6 gene的載體轉染至肺癌細胞株 A549 中，加入含有 G418 的培養基以挑選穩定表現上述基因的細胞。

(3) 萃取 RNA 及合成 cDNA :

將已轉染 HPV16E6 gene 至肺癌細胞株 A549 之 A549 細胞以 2×10^5 cells/dish 的密度培養於 3.5 cm 的細胞培養皿於 48 小時後萃取細胞的 RNA。將萃取好的細胞 RNA 利用 RT-PCR 合成 cDNA。

(4) 利用 MS-PCR 及同步定量反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)分別偵測 p16 基因的甲基化及其 mRNA 表現，以證明 HPV 確實經由影響 DNMT3b 造成 p16 基因甲基化影響 p16 抑癌基因表現:

以傳統 phenol / chloroform 方式萃取細胞之 DNA，以便進行 MS-PCR 及 DNA 定序。本研究利用 Methylation-Specific PCR (MSP) 的方法來檢測各基因啟動區的甲基化情形。MSP 的實驗原理是運用 Sodium bisulfite 化學修飾(chemical modification) 的能力，將 DNA 上的 cytosine 轉變成 uracil。假如 cytosine 原本即具有甲基化(5-methylcytosine) 的狀態時，Sodium bisulfite 則無法將其轉變成 uracil 而依然保持 cytosine 的型式，之後再使用 primer 將甲基化的 DNA 序列擴大(amplification)，進一步確認其為甲基化

(methylated) DNA。此外並設計另一組 primer，針對原本即無甲基化而由 cytosine 轉變成 uracil 的 DNA，進行 DNA 序列擴大，而得知其為未甲基化 (unmethylated) 的 DNA (Herman et al., 1996)。Bisulfite modification：取 6 μg (濃度 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) tumor DNA 加入 4 μg calf thymus DNA (Carrier DNA)、15 μl 二次水及 25 μl 0.4N NaOH (最終濃度 0.2 N) 混和均勻後，置於熱循環機反應 37°C 10 分鐘。取出，加入 30 μl 10mM Hydroquinone 與 520 μl 3M pH 5.0 的 sodium bisulfite 混和均勻，置於乾浴加熱器(dry bath) 50°C 16 個小時。接著用 Wizard DNA Clean-Up System 純化 DNA，並以此 DNA 進行 PCR 反應，PCR 產物經 2 % agarose gel 電泳後，再以 ethidium bromide 浸泡約 10-20 分鐘，再用紫外光數位顯像儀拍照電泳的結果。再確定產物後，以 GENE CLEAN III KIT (BIO 101, USA) 將產物純化出來，並採 Dye Deoxy Terminator 方法，以 ABI 3100 自動定序儀分析。real-time RT-PCR 分析 p16 基因的表現量，步驟如下：將適當大小之組織磨碎後，加入 1 ml TRIzol 於室溫反應水解組織，待組織完全水解後加入氯仿 (chloroform) 混合均勻後離心，取上清液加入於室溫反應 15 分鐘後，將 RNA 沉澱出來，再以 75% 酒精去除殘留的鹽類與 isopropanol，經離心留下 RNA 沉澱物，將 RNA 溶於 DEPC H₂O。取 5 μg RNA 以 oligo dT 為 primer，於 72°C 反應 10 分鐘，使 oligo dT 接合到 RNA 模板上，再加入 4 μl 反轉錄酵素反應 buffer、1 μl 0.1M DTT 及 1 μl 10 mM dNTP 在 42°C 作用 2 分鐘後，再加入 1 μl 反轉錄酵素 (Reverse transcriptase)，在 42°C 作用 1 小時，合成 cDNA 用做 PCR 分析用。RNA 經反轉錄作用後，利用 SYBRN GREEN Kit 進行 PCR，藉以量化

其p16 基因表現情形。

結果 & 討論：

從臨床上收集來的肺癌患者針對 p16INK4a 過度甲基化跟臨床病理因素(如：年齡、性別、腫瘤分化程度...等)進行統計分析，沒有發現彼此之間有高度的相關性。然而利用性別以及吸煙與否再進行統計分析，發現到不吸煙的女性患者其 p16INK4a 過度甲基化程度跟吸煙男性患者相當，而不吸煙男性患者其 p16INK4a 過度甲基化程度明顯比前者低。為了進一步了解 p16INK4a 基因去活化是否由於啟動子過度甲基化而造成，於是進行免疫組織化學染色去偵測肺癌中 p16INK4a 蛋白的表現。圖一 從肺癌患者的組織切片進行免疫組織化學染色，(A)為 p16INK4a 蛋白染色呈陰性反應，(B) 為 p16INK4a 蛋白染色呈陽性結果。從以上結果顯示當 p16INK4a 基因去活化時，組織免疫染色會呈陰性反應，而此現象呈現於不吸煙的女性肺癌患者才據有統計上的意義。因此推測不吸煙的女性肺癌患者其 p16INK4a 蛋白染色呈陰性反應是由於啟動子過度甲基化所造成。基於以上的結果，推測在不吸煙的女性肺癌患者其 p16INK4a 高度甲基化導致 p16INK4a 免疫組織化學染色呈陰性反應與人類乳突瘤病毒 16 或 18 型(HPV 16 or 18)感染有關。圖二 顯示人類乳突狀病毒

16 或 18 型感染和 p16INK4a 過度甲基化現象只有在不吸煙的女性患者具有高度的相關性而在不吸煙男性及吸煙男性不具有相關性，結果指出女性患者有較高頻率之 HPV 16/18 感染，因此推測 HPV 感染會促進 p16 基因發生甲基化，而導致 p16 蛋白不表現，進而使細胞癌化。而在將 HPV 感染與 p16 甲基化做統計分析後，確實發現 HPV 感染的肺癌患者之肺腫瘤組織中 p16 抑癌基因甲基化的發生頻率遠高於沒有 HPV 感染之肺癌患者。

P16 蛋白的命名是由其功能 inhibitor of cyclin-dependent kinase4(CDK4)而來(Xiong et al, 1996)，INK4 蛋白家族還包括 p15, p18, 及 p14。P16 和 p14 蛋白同為 cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)基因的產物(Sano et al, 1998)，p16 基因位於染色體 9p21 的位置，正好位於多種腫瘤抑制基因座(major tumor suppressor-1; MTS-1)上，因此亦被稱為 MST-1，主要的作用在抑制 cyclin-dependent kinase 4 及 6，進而使細胞週期停留在 G1/S 期之間(Cho et al, 2002; Sano et al, 2002)，成為細胞周期的負調節者，因此被認定為抑癌基因(Quentin et al, 2004)。主要的機制為轉錄起始區的甲基化(promoter hypermethylation)(Etoh et al, 2004; Ficarella et al, 2003; Mateos et al, 2001)、基因座同合性及異合性缺失(homozygous deletion and Loss of heterozygosity)(Bian et al., 2002; Mariatos et al., 2000)，以及基因突變，但頻率較低(Lemos et al, 2003; Vax et al, 2003)。

基因啟動區過度甲基化 (Promoter region hypermethylation)會造成基因不表

現，在許多腫瘤組織及細胞中均可發現抑癌基因啟動區的過度甲基化，因此抑癌基因啟動區的過度甲基化被認為是導致細胞癌化的原因之一 (Santini et al, 2001)。甲基化機轉是藉由DNA 甲基轉移 酉每 (DNA methyltransferase)，簡稱DNMT，將甲基轉移至 cytosine 上。甲基轉移 酉每 DNA methyltransferase (DNMT) 家族，主要以 *DNMT1* 為主，已有報導發現 *DNMT1* mRNA 在大腸癌、前列腺癌與肺癌 (Robert et al, 2003; Sato et al, 2002; Schagdarsurengin et al, 2003) 細胞株過度表現，且在腫瘤組織中表現量高於非腫瘤組織 (Robertson et al, 1999)，而 *DNMT1* 的過度表達推測很可能參與腫瘤細胞之增生。另外有文獻指出 *DNMT3* 家族，包括：*DNMT3a* 和 *DNMT3b*，在膀胱癌、大腸直腸癌、腎臟癌與胰臟癌等惡性腫瘤組織中會過度表現 (Robertson et al, 1999)，而且與 CpG island 發生甲基化亦有關係 (Bachman et al, 2001; Okano et al, 1999)。因此本研究收集正常的肺細胞株與肺癌細胞株，並進一步萃取RNA及合成cDNA，再利用專一性的primer分析DNMT3b於細胞中的表現情形。本實驗分析肺正常細胞株 (MRC-5、WI-38與Beas-2B)和肺癌細胞株 (H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、H460、CL 1-0與CL 1-5)，進一步萃取RNA再合成cDNA，接著利用專一性的primer以RT-PCR增幅方式分析DNMT3b於細胞中的表現情形。由圖三 顯示，由於 β -actin是細胞內的housekeep gene，其表現量在肺正常細胞株 (MRC-5、WI-38與Beas-2B)與肺癌細胞株 (H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H23、H460、CL 1-0與CL 1-5)中一致，因此本實驗以 β -actin作為定量依據。首先，無論在肺正常細胞株 (MRC-5、WI-38與Beas-2B)還是肺癌細胞

株 (H1355、H1299、A549、Calu-1、CH27、H460、CL 1-0與CL 1-5)中皆可發現DNMT3b的表現，但只有H23肺癌細胞株測不到DNMT3b的表現量，另外在WI-38、Beas-2B、Calu-1、CH27、H460、CL1-0與CL1-5有alternative splicing的現象發生。因此，本實驗接著以已轉染HPV16 E6的A549跟為轉染的A549進一步萃取RNA再合成cDNA，接著利用專一性的primer以RT-PCR增幅方式分析DNMT3b於細胞中的表現情形。圖四 中以 β -actin作為定量依據，HPV16 E6作為A549是否有轉染HPV16 E6指標，從結果中發現有轉染HPV16 E6的A549其DNMT3b的表現量比沒有轉染的A549來的少。但有文獻指出 p16INK4a 基因轉錄起始區過度甲基化與DNMT3b 蛋白的表現有正相關(P= 0.023)，但與DNMT1 蛋白表現無關，因此推測HPV 感染會透過增加DNA methyltransferase 3b(DNMT3b)的蛋白表現，而促進p16 之甲基化(Lin et al, 2005)。圖五 (A)為構築DNMT3b轉錄起始區的載體圖譜，利用PCR 反應合成DNMT3b 的轉錄起始區，將此片段純化後與vector (stable or inducible)進行ligation。將 ligation 完後的產物送入 XL-10 competent cells，培養後萃取載體DNA，以DNA 定序儀確認接入基因之方向性及序列之正確性。圖五 (B)為DNMT3b 轉錄起始區的DNA序列。

參考文獻：

Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* **276**(34): 32282-32287

- Bohlmeier T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, Shroyer KR (1998) Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(2): 265-269
- Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H (2001) The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res* **61**(7): 2799-2803
- Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, Lee H (2003) The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. *Cancer* **97**(6): 1558-1563
- Cho NH, Kim YT, Kim JW (2002) Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J* **43**(6): 722-728
- de Villiers EM (1992) Hybridization methods other than PCR: an update. *IARC Sci Publ*(119): 111-119
- Divine KK, Pulling LC, Marron-Terada PG, Liechty KC, Kang T, Schwartz AG, Bocklage TJ, Coons TA, Gilliland FD, Belinsky SA (2005) Multiplicity of abnormal promoter methylation in lung adenocarcinomas from smokers and never smokers. *Int J Cancer* **114**(3): 400-405
- Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S (2004) Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* **164**(2): 689-699
- Ficorella C, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Fusco C, Sinopoli NT, De Galitiis F, Di Rocco ZC, Porzio G, Frati L, Gulino A, Martinotti S, Marchetti P (2003) P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer. *Oncol Rep* **10**(1): 169-173
- Hennig EM, Suo Z, Karlsen F, Holm R, Thoresen S, Nesland JM (1999) HPV positive bronchopulmonary carcinomas in women with previous high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Acta Oncol* **38**(5): 639-647
- Hirayasu T, Iwamasa T, Kamada Y, Koyanagi Y, Usuda H, Genka K (1996) Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Pathol* **49**(10): 810-817
- Iwamasa T, Miyagi J, Tshako K, Kinjo T, Kamada Y, Hirayasu T, Genka K (2000) Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract* **196**(4): 209-218

- Lemos JA, Defavery R, Scrideli CA, Tone LG (2003) Analysis of p16 gene mutations and deletions in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Sao Paulo Med J* **121**(2): 58-62
- Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC, Cheng YW (2005) An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett* **226**(1): 77-84
- Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, Laszlo J (1984) Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res* **44**(12 Pt 1): 5940-5958
- Marsit CJ, Kim DH, Liu M, Hinds PW, Wiencke JK, Nelson HH, Kelsey KT (2005) Hypermethylation of RASSF1A and BLU tumor suppressor genes in non-small cell lung cancer: implications for tobacco smoking during adolescence. *Int J Cancer* **114**(2): 219-223
- Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R, Balanzategui A, Gonzalez MI, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez J, Caballero MD, Gonzalez M, San Miguel JF (2001) p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol J* **2**(3): 146-149
- Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Pollanen R, Bloigu R, Vahakangas K, Paakko P (1995) 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
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-257
- Quentin T, Henke C, Korabiowska M, Schlott T, Zimmerman B, Kunze E (2004) Altered mRNA expression of the Rb and p16 tumor suppressor genes and of CDK4 in transitional cell carcinomas of the urinary bladder associated with tumor progression. *Anticancer Res* **24**(2B): 1011-1023
- Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR (2003) DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* **33**(1): 61-65
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* **27**(11): 2291-2298
- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T (2002) Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int* **52**(5-6):

375-383

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T (1998) Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int* **48**(8): 580-585

Santini V, Kantarjian HM, Issa JP (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* **134**(7): 573-586

Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y (2002) The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene* **21**(31): 4822-4829

Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, Schlegelberger B, Dammann R (2003) Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **22**(12): 1866-1871

Serraino D, Piselli P, Scognamiglio P (2001) Viral infections and cancer: epidemiological aspects. *J Biol Regul Homeost Agents* **15**(3): 224-228

Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pollanen R, Vahakangas K, Lehto VP, Paakko P (1996)

Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma. *Thorax* **51**(9): 887-893

Szabo I, Sepp R, Nakamoto K, Maeda M, Sakamoto H, Uda H (1994) Human papillomavirus not found in squamous and large cell lung carcinomas by polymerase chain reaction. *Cancer* **73**(11): 2740-2744

Thomas P, De Lamballerie X, Garbe L, Douagui H, Kleisbauer JP (1995) Detection of human papillomavirus DNA in primary lung carcinoma by nested polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**(8): 1093-1097

Vax VV, Bibi R, Diaz-Cano S, Gueorguiev M, Kola B, Borboli N, Bressac-de Paillerets B, Walker GJ, Dedov, II, Grossman AB, Korbonits M (2003) Activating point mutations in cyclin-dependent kinase 4 are not seen in sporadic pituitary adenomas, insulinomas or Leydig cell tumours. *J Endocrinol* **178**(2): 301-310

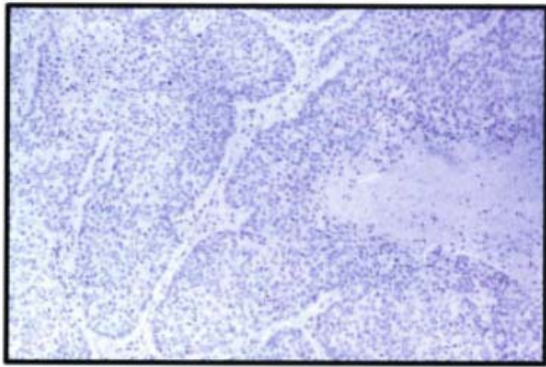
Xiong Y, Kuppaswamy D, Li Y, Livanos EM, Hixon M, White A, Beach D, Tlsty TD (1996) Alteration of cell cycle kinase complexes in human papillomavirus E6- and E7-expressing fibroblasts precedes neoplastic transformation. *J Virol* **70**(2): 999-1008

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

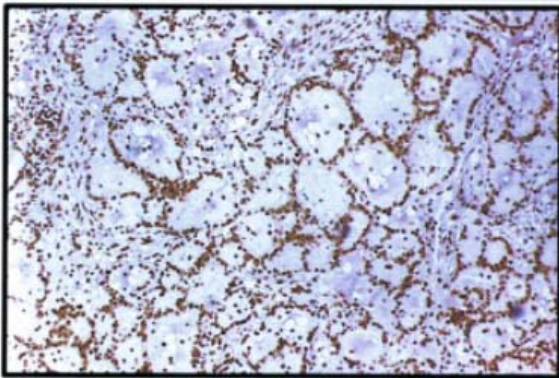
zur Hausen H (1991) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**(1): 9-13

圖表說明

(A)



(B)



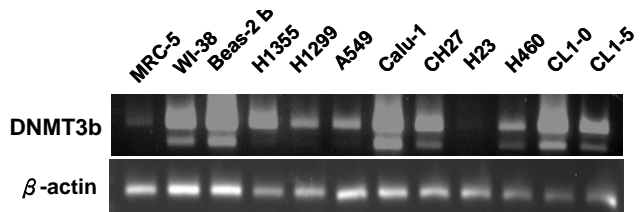
圖一、 Representative of p16INK4a positive and negative protein immunostaining in paraffin sections of lung tumors.

(A) A representative negative immunostaining in lung adenocarcinoma.
 (B) Representative positive immunostaining in lung adenocarcinoma.

HPV 16 or 18 infections	p16INK4a hypermethylation							
	All studied cases (n = 166)		Nonsmoking				Smoking, male (n = 67)	
	Absent, n (%)	Present, n (%)	Female (n = 58)		Male (n = 4)		Absent, n (%)	Present, n (%)
Negative	33 (44)	42 (56)	10 (67)	5 (33)	9 (56)	7 (44)	14 (32)	30 (68)
Positive	43 (47)	48 (53)	13 (30)	30 (70)	17 (68)	8 (32)	13 (57)	10 (43)
<i>p</i>	0.675		0.017		0.446		0.05	

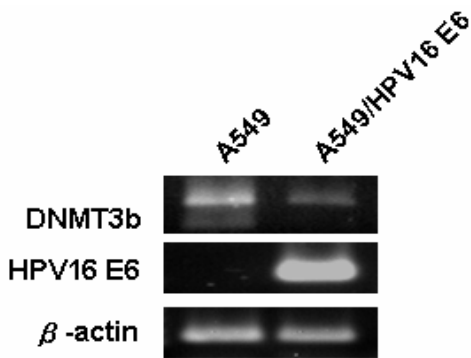
圖二. Correlation between p16INK4a hypermethylation and HPV infection .

The 3 categories of lung tumors in this study were nonsmoking female, nonsmoking male and smoking male lung tumors, which were categorized based on gender and cigarette smoking status.



圖三、 DNMT3b gene mRNA expression in normal lung and lung tumor cell lines.

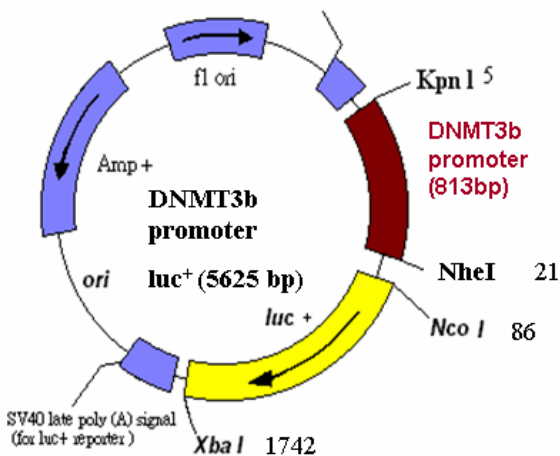
Representative of DNMT3b expression in normal lung and lung tumor cell lines. Expression was analyzed by RT-PCR of total RNA (2 g) amplified by RT-PCR. Equal amount of DNA was loaded, as confirmed by the intensity of β -actin after ethidium bromide staining.



圖四. DNMT3b gene mRNA expression in A549 and A549 transfected with HPV16 E6 gene cell lines .

Representative of DNMT3b expression in A549 and A549 transfected with HPV16 E6 cell lines. Expression was analyzed by RT-PCR of total RNA (2 g) amplified by RT-PCR. Equal amount of DNA was loaded, as confirmed by the intensity of β -actin after ethidium bromide staining.

(A)



(B)

5'- CGTGGAGACA GACCACAAGC AGGTAAACAA
 GCAAATATGT AAGTCCCAGG TCAGATAAAT
 TTTAGGAAGT GCTGTTTTCC AGTGGTTCAA
 TGGTCATCCC AGGGCAGAGG TGGGAGACCT
 GCTGAGGGCG GCTTCTCCCT CAGTCAGTCC
 ATGCCTGCAG GGTCTGGAAC CCAGGTAGCC
 AGAGACCCGC TGGTCTTCTT TCCCCTCCCC
 TGCCCTCCCC TCCCTTCAAG ATGGCTGACA
 AAGGCCGGGC TGGGTGGAAG GAAGGGAGGA
 AGGGCGAGGC AGAGGGTCCA AAGCAGGATG
 ACAGGCAGGG GCACCGCGGC GCCCCGGTGG
 CACTGCGGCT GGAGGTGGGG GTTAAAGCGG
 AGACTCTGGT GCTGTGTGAC TAC AGTGGGG
 GCCCTGCCCT CTCTGAGCCC CCGCCTCCAG
 GCCTGTGTGT GTGTCTCCGT TCGGGTTGAA
 AGGAGCCCGG GAAAAAGGC CCCAGAAGGA
 GTCTGGTTTT GGACGTCTGA CCCACCCCT
 CCCGCTTAGG GCTTCTGATC CCCAGGG TG
 ATTTCACTGG CCCGGGGTTG GGAGGGCAGG
 GGGCCAGGGG GCGGAGCCCG CGGAGAGGGG
 CGGAGGGGAG GCTCCGAGCG ATTTCAAATT
 TCCCTCGTCC CCGCCCCCCC GTTCCCCC
 CGCGCCCGGG CGGGGATCTG AGTGGCTGCGG
 CGGGGGCACC CCCGGGCGGG GGCGGGGCAA
 GAGCCGGGCC GGGGCTACAA GGGGAGTCGG
 CACCGCCCCC TCCCCACCCA CTCCCGCTGC
 CCCGTCCGGC CCGCGCCGCT TCCTCGCAGC
 AGCTG - 3'

圖五. Construction of DNMT3b promoter.

(A) DNMT3b promoter plasmid map.

(B) DNMT3b promoter sequence.