

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以 HPV DNA 定序和 6 integrin 表現探討女性肺癌感染 HPV 之路徑

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-040-023-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：鄭雅文

共同主持人：李輝

計畫參與人員：吳恆祥

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1 年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

以 HPV DNA 定序和 6 integrin 表現探討女性肺癌感染 HPV 之路徑

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2314-B-040-023

執行期間： 92 年 8 月 1 日至 93 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：吳恆祥

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 93 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題計畫成果報告

以 HPV DNA 定序和 $\alpha 6$ integrin 表現探討女性肺癌感染 HPV 之路徑

Comparative HPV DNA sequence of blood, pap smear and lung tumor from HPV infected-female cancer patient and the role of $\alpha 6$ integrin in HPV infection in lung tumor

計畫編號：NSC 92-2314-B-040-023

執行期限：92 年 08 月 01 日至 93 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

本研究室過去研究發現不抽煙之女性肺癌患者之肺腫瘤有高達 60%和 73%的高危險性人類乳突瘤病毒 16 和 18 型 (human papillomavirus 16/18) 的感染率,此感染率遠高於男性肺癌患者(HPV 16, 24%; HPV 18, 26%; Cheng et al., 2001) 同時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 (Chiou et al., 2003)。挪威及日本的研究發現 HPV 感染之肺癌患者中,有 80% 的患者過去有 cervical intraepithelial neoplasia III (CIN III)的病史。因此推測肺腫瘤組織中的 HPV, 有可能來自子宮頸, 經血液循環而感染至肺組織。過去本研究室經由比對肺腫瘤組織和血液中之 HPV 16/18 之 E6, E7 及 L1 的 DNA 序列, 有 81% (13 /16) 的肺癌患者之腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中相同。而本計畫, 共收集 9 位 HPV 感染之女性肺癌患者之肺腫瘤組織、周邊血液及子宮頸抹片, 利用 nest-PCR 及 DNA 定序分析其 E6, E7 和 L1 的 DNA 序列,

是否具同源性? 結果發現在 9 位肺癌患者中有三位可同時在肺腫瘤組織、周邊血液及子宮頸抹片之 DNA 中同時測到 HPV16/18DNA 的存在且經由定序結果發現三者同源。因此推測女性肺癌患者肺腫瘤組織中之 HPV 可能來自於來自子宮頸感染。最近在子宮頸癌的相關研究中指出 HPV 可能是透過與 $\alpha 6$ -integrin 結合而感染宿主細胞, 本研究亦利用免疫組織化學染色法分析肺腫瘤組織中之 $\alpha 6$ -integrin 蛋白的表現量, 並與血液及腫瘤組織中之 HPV 感染做一統計分析, 但結果並無統計上之相關性, 因此肺腫瘤組織中之 HPV 感染可能透過與其他受體結合所致。

關鍵字：肺癌，人類乳突瘤病毒

ABSTRACT

High prevalence of HPV 16/18 infections in female lung cancer patients compared to male lung cancer patients (60% vs. 24% for HPV 16, 73.3% vs. 26% for HPV 18) were shown in our previous report (Cheng et al., 2001). Our recent report

showed that there was an approximately 70% concordance between HPV 16 DNA detection in peripheral blood cells and lung tumor tissues of lung cancer patients (Chiou et al., 2003). Previous studies indicated that about 80% of HPV infected-female lung cancer patients from Japan and Norway had a history of cervical intraepithelial neoplasia III. Our preliminary data showed 81% (13 of 16) lung cancer patients with an identical HPV 16/18 E6, E7 and L1 DNA sequences between blood lymphocytes and lung tumors. Based on our previous results, we strongly suggest that HPV infection in lung tumors may be transmitted from cervix through blood circulation. In this project, lung tumor tissues, blood and pap smear of 9 female lung cancer patients were collected to analyze the HPV infection status and E6, E7, L1 sequence. Our results indicated that 30% (3 of 9) female lung cancer patients have HPV positive in lung tumor tissues, blood and pap smear and the E6, E7, L1 sequence variants were <2%. Thus, we suggested that the HPV 16/18 infection in lung tumor tissues may originate from cervix infection. α 6-integrin may act as a receptor for HPV infected cervical cancer cells has been shown previously. In this study, α 6-integrin protein expression in 70 lung cancer patient tumor tissues were analysis by immunohistochemistry. No correlate between HPV infection and α 6-integrin protein expression were shown in our results. Therefore, we suggested that infection of HPV in lung tumor cell may through binding with other receptor.

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。另外，流行病學的研究指出，中國婦女抽菸人口的比例低於其他種族，但肺癌盛行率卻逐年升高 (Deng and Gao et al., 1985)。同時發現中國女性肺癌之細胞型態，大多屬肺腺癌 (Maclennan et al., 1977; Kung et al., 1984; Gao et al., 1987)。近年來台灣地區由於抽菸量降低，與抽菸相關性最高之鱗狀上皮細胞肺癌有逐年下降的趨勢，但是肺腺癌之發病率卻逐年增加 (Department of Health, ROC, 1984 – 2000)，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。另外，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, $P < 0.0001$)。而 HPV 18 則有 9.2 倍 (95% CI, 4.2-20.2, $P < 0.0001$)。若 HPV 16/18 同時感染者則其危險性更高達 75.7 倍 (95%CI, 9.8-582.1, $P < 0.0001$)。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)。而經由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 序列進行比對之初步結果亦發現有 80% 的肺癌患者其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中相同，因此推測肺腫瘤組織中的 HPV 可能來自於血液或經由血液傳染至其他組織。

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。Thomas et al. (2001) 發現從事性工作之女性有較高之高危險型 HPV 感染率。近幾年之研究發現，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% (416/1205)，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)。

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。而李輝教授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。

而 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)。本人之初步研究結果亦發現在肺腫瘤轉移之被轉移器官之腫瘤切片中的腫瘤細胞、血管及血球細胞均可以原位雜交試驗測到 HPV DNA 的存在。經由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 序列進行比對之初步結果亦發現有 80% 的肺癌患者其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液中相同，因此推測肺腫瘤組織中的 HPV 可能來自於血液或經由血液傳染至

其他組織。而在我們的研究族群中也發現不抽煙之女性肺癌患者之肺腫瘤有高達 60% 和 73% 的 HPV 16/18 的感染率，此感染率遠高於男性肺癌患者 (HPV 16, 24%; HPV 18, 26%)，因此推測女性肺癌患者肺腫瘤組織中之 HPV 可能來自於子宮頸感染。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 與周邊血液及子宮頸感染之 HPV 是屬於同源性之 HPV，本計劃擬收集 HPV 感染之女性肺癌患者之子宮頸抹片，利用 nest-PCR、*in situ* hybridization 及 DNA 定序分析子宮頸是否有 HPV 16/18 感染？同時分析其 E6、E7 和 L1 的 DNA 序列，是否與肺腫瘤組織感染之 HPV 相同？以釐清肺腫瘤組織中之 HPV 感染是否與子宮頸之 HPV 感染同源？同時與血液中的 HPV 的序列做一比對，以了解同一肺癌患者之肺腫瘤組織、子宮頸抹片以及血液三者間之 HPV 序列是否一致？以證明女性肺癌患者之 HPV 感染來自子宮頸之假設。

上述實驗將可證明肺腫瘤組織中之 HPV 感染與子宮頸之 HPV 感染的相關性，但 HPV 如何進入肺細胞更是一值得探討的重要課題。在許多子宮頸癌的相關研究中指出 HPV 可能是透過與 α 6-integrin 結合而進入細胞， α 6-integrin 屬於 integrin 家族中的一員，integrin 是位細胞膜上的接受體 (receptor)，分為 α 及 β 兩種亞型，而目前已知的 α -integrin 共有 17 種， β -integrin 有 8 種，此接受體會與

Arg-Gly-Asp 的胺基酸序列結合使物質進入細胞，此 Arg-Gly-Asp 胺基酸序列稱為 RGD。RGD 亦表現於許多種類的病毒中，如：腺病毒、乳突瘤病毒，且在病毒的感染上扮演了重要的角色 (Croyle et al., 1998)。在這許多形式的 integrin 中， $\alpha 6$ -integrin 可能是最主要與 HPV 感染有關的接受體，此一論點最早由 Evander et al., (1997) 所發現，而 Yoon et al., (2001) 的研究中也發現子宮頸癌細胞中的 HPV 感染與 $\alpha 6$ -integrin 的蛋白表現有關，但與 $\beta 1$ -integrin 及 $\beta 4$ - integrin 的蛋白表現無關。因此本研究亦將利用免疫組織化學染色法分析肺腫瘤組織中之 $\alpha 6$ - integrin 蛋白的表現量，並與血液及腫瘤組織中之 HPV 感染做一統計分析，以了解肺腫瘤組織之 $\alpha 6$ - integrin 蛋白與 HPV 感染之相關性。總之，本研究之結果將提出有力之分子層次證據，證明肺癌患者之 HPV 感染可能來自子宮頸感染。

參、結果

本研究共收集 9 位女性肺癌患者之腫瘤組織、血液檢體及子宮頸抹片進行 HPV 之同源性分析。並利用 nested-PCR 偵測這 9 位肺癌患者血球、肺腫瘤組織及子宮頸抹片中 HPV 16/18 感染情形。結果發現 9 位肺癌患者中有 3 位其血球、肺腫瘤組織及子宮頸抹片中均可測到 HPV 16 及 HPV 18 DNA 的存在。另外，有一位患者可同時在血球及肺腫瘤組織中測到 HPV 16 及 HPV 18 DNA，一位患者可在肺腫瘤組織中測到，有兩位可在子宮頸抹片中測到 HPV 16 及 HPV 18 DNA 的存在，另外兩外則在三者均無法測到 (Table 1)。結果發現有 33.3% (3 of 9) 的肺癌患者之 HPV 16/18 感染在血球、肺腫瘤組織及之子宮頸抹片 HPV 感染具有一致性，因此推測

HPV 16 及 18 有可能經由性行為傳染在經由血球感染至肺臟。

為證明血液、腫瘤組織與子宮頸抹片中之 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，並與血液與子宮頸抹片中所測得之 HPV DNA 序列進行比對，結果發現在 3 位血液、腫瘤組織與子宮頸抹片中均可測到 HPV16 及 18 的肺癌患者其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液及子宮頸抹片中的 HPV DNA 序列完全相同，屬於同一型 (Fig.1 and Fig. 2)。而在肺腫瘤組織及血液均可測到 HPV16/18 的肺癌患者亦發現其腫瘤組織中的 HPV DNA 序列與血液及子宮頸抹片中相同，序列之差異性小於 2%，亦屬於同一亞型之 HPV。由此同源性分析本研究更進一步推測肺癌患者之 HPV 感染可能來自子宮頸感染經由血液循環到肺。

研究中發現子宮頸癌細胞中的 HPV 感染與 $\alpha 6$ -integrin 的蛋白表現有關，本研究亦進一步利用免疫組織化學染色法分析 70 位肺癌患者肺腫瘤組織中之 $\alpha 6$ - integrin 蛋白的表現，並與血液及腫瘤組織中之 HPV 感染做一統計分析，以了解 HPV 是否藉由與 $\alpha 6$ - integrin 結合而進入細胞。結果發現 $\alpha 6$ - integrin 蛋白的表現與臨床之相關資料包括：性別、年齡、腫瘤形式、腫瘤大小、是否有淋巴結轉移均無統計上之相關性而在與 HPV 感染之相關性方面，亦發現不論是 HPV16 或是 HPV18 的感染均與 $\alpha 6$ - integrin 蛋白的表現無統計上之相關性 (Table 2)。根據此研究結果推測肺腫瘤組織中之 HPV 感染可能不是透過與 $\alpha 6$ - integrin 蛋白結合而進入肺細胞。

綜合以上結果，我們推測肺癌患者之

HPV 感染可能經由性行為感染子宮頸在經由血液循環到肺，且肺腫瘤組織中 HPV 16/18 之感染與否和 $\alpha 6$ - integrin 蛋白的表現無關，顯示 HPV 進入肺細胞的接受體 (receptor) 可能與子宮頸細胞不同。

肆、討論

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)。顯示 HPV 病毒可經由細胞的轉移而至其他器官。此外，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、週邊血液及子宮頸抹片中之 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。

在許多子宮頸癌的相關研究中指出 HPV 可能是透過與 $\alpha 6$ - integrin 結合而進入細胞。在這許多形式的 integrin 中， $\alpha 6$ -integrin 可能是最主要與 HPV 感染有關的接受體，此一論點最早由 Evander et al., (1997) 所發現，而 Yoon et al., (2001) 利用皮膚細胞 (HaCaT cell) 的研究中也發現子宮頸癌細胞中的 HPV 感染與 $\alpha 6$ -integrin 的蛋白表現有關，但本研究利用免疫組織化學染色法分析肺腫瘤組織中之 $\alpha 6$ - integrin 蛋白的表現，與血液及腫瘤組織中之 HPV 感染之相關性時卻發現兩者間並無統計上的相關性。Shafti-Kermat et al., (2003) 利用缺乏 HSPGs (Heparan Sulfate Protoglycans) 蛋白的角質細胞所做的研究發現，將 HSPGs 系列蛋白包

括：syndecan-1, syndecan-4 或 glypican 轉入細胞後，會增加以人工合成之病毒顆粒 (virus-like particles; VLP) 與角質細胞結合的能力，且此結合能力的增加可能是透過 HSPGs 蛋白增加細胞膜表面 heparan sulfate 的量所致，此外作者亦推測 HPGs 可能扮演了細胞膜表面受體的角色，藉由與此受體的結合而使 HPV 進入細胞，且在角質細胞與 HPV 感染的相關性中 HPGs 所扮演的角色可能更勝於 $\alpha 6$ - integrin。因此 HPGs 在 HPV 感染肺細胞的過程中扮演了何種角色似乎是一個有趣的研究課題，本研究室亦將進一步針對 HPV 感染與 HPGs 蛋白之相關性作進一步研究以釐清肺細胞及子宮頸上皮細胞這兩種不同形式的細胞，是否是經由與不同受體而感染 HPV。

伍、參考文獻：

- Buchanan J. and Niel-Fisher NS. Role of immune function in human papillomavirus infection. *JAMA*, 286(10):1173-1174, 2001.
- Cheng YW, Chiou HL, Sheu G.T, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, and Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among non-smoking Taiwanese women. *Cancer Res.*, 61: 2799-2803, 2001.
- Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Lee H. 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):1558-63, 2003.
- Croyle MA, Walter E, Janich S, Roessler BJ, and Amidon GL. Role of integrin expression in adenovirus-mediated gene delivery to the intestinal epithelium. *Hum Gene Ther*, 9: 561-573, 1998.
- 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):271-274, 1985.
- Devesa SS, Blot WJ, and Fraumeni JF. Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. *J. Nat. Cancer Inst.*, 81(20):1568-1571, 1989.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, QI YM, Hengst K, and McMillan NA. Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J virol*, 2449-2456, 1997.
- Gao YT, Blor 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 metastase in two patients. *Gynecol Oncol*, 51, 281-286, 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):639-647, 1999.
- Iwamasa T, Miyagi J, Tshako K, Kinjo T, Kamada Y, Hirayasu T, and Genka K. Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Pathol. Res. Practice*, 196(4):209-218, 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. Biomar. Prev.*, 10(2):101-106, 2001.
- Kung IT, So KF, Lam TH. Lung cancer in Hong Kong Chinese: mortality and histological types, 1973-1982. *Br. J. Cancer*, 50(3):381-388, 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, 1333-1337, 1990.
- 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, 156-160, 1994.
- Olatunbosun O, Deneer H, and Pierson R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstetrics & Gynecol.*, 97(3):357-360, 2001.
- 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.
- Shufti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparin sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomavirus. *J virol.*, 77(24): 13125-13135, 2003.
- 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):62-69, 2001.
- 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):740-748, 2001.
- van Ranst MA, Tachezy R, Delius H, and Burk RD. Taxonomy of the human papillomavirus. *Papillomaviru Rep*, 4: 61-65, 1993.
- Yoon CS, Kim YD, Park SN, and Cheong SW. $\alpha 6$ integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 668-673, 2001.
- ## 六、計畫成果自評部份
1. 本計畫原先擬收集 30 位女性肺癌患者之肺腫瘤組織、周邊血液及子宮頸抹片分析其 HPV 感染情形及同源性，但因說服肺癌患者做子宮頸抹片相當困難因此只分析 9 位患者之感染情形，與原先計畫預計人數有落差，此部分仍努力與肺癌患者溝通中，希望能收集更多檢體進行分析。
 2. 目前研究成果整理如下：
Cheng YW, Chiou HL, Chen JT, Chiou MC, Lin TS, Lai WW, Chen CY, and Lee H. Gender difference in human papillomavirus infection for non-small cell lung cancer in Taiwan. *Lung Cancer*, 46: 165-170, 2004.
Cheng YW, Chen PL, Chiou HL, Chen JT, Chen CYi, Chou MC, and Lee H. Involvement of hpv 16/18 e6 status in taiwanese lung cancer with p53 protein expression. *Int J Cancer* submitted.

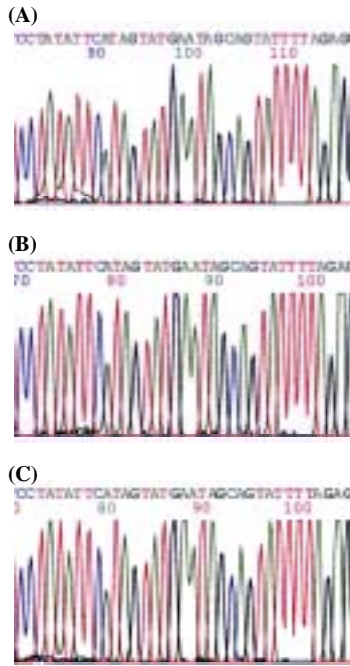


Fig. 1. Representative results of direct DNA sequencing analysis of HPV 16 E6 amplified from lung cancer patient's (A) lung tumor tissues, (B) peripheral blood, and (C) pap smear.

Table 1. The Presence of HPV 16 DNA detected by Nested PCR in lung tumor tissue, blood circulation and pap smear in nine female lung cancer patients.

Patient no.	HPV 16 DNA		
	Tumor tissue	blood	Pap smear
1	+	+	+
2	-	-	+
3	+	+	+
4	+	+	-
5	-	-	-
6	+	-	-
7	-	-	+
8	-	-	-
9	+	+	+

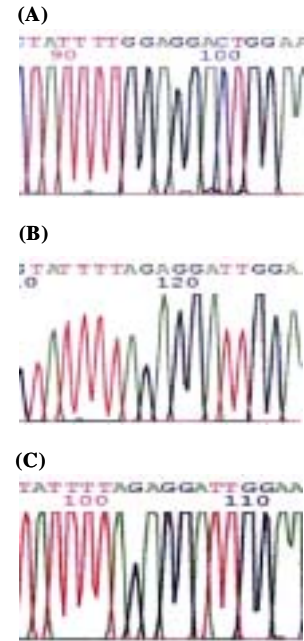


Fig. 2. Representative results of direct DNA sequencing analysis of HPV 16 L1 amplified from lung cancer patient's (A) lung tumor tissues, (B) peripheral blood, and (C) pap smear.

Table 2. Correlation between $\alpha 6$ -integrin and clinical parameter in lung cancer patient tumor tissues analysis by immunohistochemistry.

Parameter	$\alpha 6$ -integrin		P
	- (n=20)	+ (n=50)	
Gender			
F (n=27)	10	17	0.279
M (n=43)	10	33	
Smoking habits			
- (n=40)	15	25	0.067
+ (n=30)	5	25	
Tumor type			
A (n=36)	14	22	0.066
SQ (n=34)	6	28	
Tumor stage			
I (n=24)	6	18	0.420
II (n=12)	2	10	
III (n=34)	12	22	
T factor			
1 (n=3)	1	2	0.981
2 (n=48)	13	35	
3 (n=13)	4	9	
4 (n=6)	2	4	
N factor			
0 (n=32)	9	23	0.387
1 (n=12)	5	7	
2 (n=23)	6	17	
3 (n=3)	0	3	
HPV 16			
- (n=42)	11	31	0.601
+ (n=28)	9	19	
HPV 18			
- (n=42)	12	32	0.789
+ (n=28)	8	18	