

參、文獻總論

一、引言

(一)臺灣肺癌的重要性

根據 2007 年行政院衛生署最新統計資料顯示：2005 年國人癌症死亡率高達每十萬人口 163.8，佔當年死亡總人口數的 26.8%。在臺灣地區大約每四個死亡人口就有一人死於癌症，每五個癌症死亡人口就有一人死於肺癌。肺癌死亡率在女性及男性分別高居癌症死亡的首位及第二位，每十萬女性人口肺癌死亡率為 19.9，男性則為 44.0，每年約有 7000 多人死於肺癌 (1)。近年來儘管肺癌的診治隨著醫學的進步也有相當的進展，但是肺癌的治療成果仍然有進步空間。其中最大的原因是當確定診斷出患有肺癌時，多已發生一段時間，甚至可能轉移至其他部位而難以利用手術或藥物治癒，導致死亡率偏高 (2, 3)。

肺癌通常分成二大類型：小細胞肺癌 (Small cell lung cancer, SCLC) 和非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC)，大部分 (75-88%) 台灣地區肺癌病人是屬於非小細胞肺癌；依據組織學形態分析，又可將非小細胞肺癌分為肺腺癌 (Adenocarcinoma, AD)、鱗狀上皮細胞癌 (Squamous carcinoma, SQ) 及大細胞癌 (Large cell carcinoma, LC) 三種次形式 (4)。肺腺癌為目前肺癌數量最多的一種

類型，常常是在有遠端轉移之後才出現臨床症狀，多由血路轉移，無吸煙者罹患肺癌常為此類。鱗狀上皮細胞癌又稱表皮樣癌，常見於男性吸煙者，早期多為局部向外延伸的轉移，後期則經血路擴散。大細胞癌的生長速度較緩慢，會經由血路及淋巴擴散。非小細胞肺癌的分期簡單可分為第一、二、三 A、三 B 和四期；第一、二期屬於局部早期發現，第四期為末期已轉移到脊椎骨、腦部、肝臟、皮膚等遠處的組織。非小細胞肺癌治療的原則是依據其分期之早晚而不同，局部早期以手術治療（開刀）為原則，但手術後發生轉移或復發的機率甚高，第三 B 及第四期是屬於晚期無法開刀，須依病人身體狀態及意願，接受化學治療及/或放射線治療，但不能開刀的病例對化學藥物及放射線治療大多不敏感。由於上述原因，肺癌病人的預後不佳。整體而言，五年的存活率僅約 13%~15% (5)。

(二)肺癌之相關癌症基因分類以及本研究動機依據

目前所知，癌症的形成牽涉了許多因素，某些環境因子會導致肺癌形成，例如：二手煙、炒菜油煙、香燭、工作場所或環境污染物可能導致肺癌的形成之外 (3, 6, 7)。遺傳因子的改變也在肺癌形成過程扮演重要角色，目前的醫學研究已經知道癌症的發生是由於許多的基因發生變異，而且是許多基因同時發生基因變異而造成。與癌症形成有關的基因主要可以分成兩大類，一為致癌基因 (oncogene) 的過度

活化，如 β -catenin (8)；一為抑癌基因 (tumor suppressor gene) 的失去活性，如 *p53* (9)，*Retinoblastoma (Rb)* (10)等。但是詳細的分子致癌機制到目前為止尚未完全清楚明瞭，因此研究台灣地區肺癌發生的原因，實在是一項刻不容緩的工作。

另外，在本實驗室先前使用了 177 個微衛星標竿 (Microsatellite marker) 偵測 71 位台灣非小細胞肺癌病人全基因體異質性喪失 (Genome-wide loss of heterozygosity, LOH) (Fig. 1)，研究結果中發現，台灣地區肺癌病人的染色體 1p36.2 有很高的基因座缺失 (LOH) 頻率發生，而這區域含 *ICAT* 基因，經由文獻搜尋發現 *ICAT* 蛋白會抑制 Wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑 (Fig. 2)；另外，有研究顯示 *HBPI* 抑癌基因也有抑制 Wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑的功能。因此，本論文即是針對參與 Wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑基因：*ICAT* 及 *HBPI*，進行一系列之基因變異分析，並偵測其啟動子甲基化情形、mRNA 與蛋白之表達情形，同時探討其與臨床病理資料之間的相關性，冀望能找出 *ICAT* 及 *HBPI* 基因與 β -catenin 蛋白及其下游基因之間的關係，並釐清與台灣地區肺癌病人有關的致病機轉。

(三)Wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑與癌症形成之關係

Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑在早期生長發育過程中扮演重要的角色。Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑的起始，是經由 Wnt 蛋白與細胞膜

上的 frizzled 受體結合，使 Dishevelled (Dvl) protein 磷酸化，造成 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) 蛋白失去功能，因此原本細胞質中 β -catenin/APC/AXIN/AXIN2 的複合體便會分離 (11)。當細胞質中的 β -catenin 蛋白累積過多，便會進入細胞核和 T-cell factor (TCF)/LEF 蛋白結合而活化其下游基因造成許多原致癌基因過度表現，進而導致腫瘤產生 (12)。研究中發現， β -catenin 蛋白會和 TCF/LEF 蛋白結合共同活化一些會引發癌症的基因，例如：*c-jun*、*c-myc*、*cyclin D1* (13, 14) 及 *MMP7* (15)。在細胞核中 ICAT 及 HBP1 蛋白分別會與 β -catenin 蛋白及 TCF 蛋白結合，而減少 β -catenin 蛋白和 TCF/LEF 蛋白結合，因此無法活化其下游基因。如果當 β -catenin 蛋白在細胞核不正常的累積，則其與 TCF/LEF 蛋白結合而活化其下游基因造成許多原致癌基因過度表現，進而導致腫瘤產生的機會增加；若此細胞之 β -catenin/TCF/LEF 轉錄拮抗蛋白 ICAT 及 HBP1 又失去活性，將會使腫瘤細胞更加癌化。

二、*ICAT*、*HBP1* 抑癌基因之結構與功能

(一)*ICAT* 抑癌基因之結構與功能

ICAT 基因，全名為 inhibitor of β -catenin and TCF，位於染色體 1p36.2 的區域，全長 62kb，包含 6 個 exons，可轉譯出一段 81 個胺基酸的蛋白質 (16) (**Fig. 3**)，ICAT 蛋白的 N 端是個 helical domain

會與 β -catenin 的連續重複區域 armadillo repeats 11-12 結合，C 端會與 β -catenin 的 armadillo repeats 5-10 結合，而此區域也是 TCF 的結合位置 (17)，因此在細胞核中 ICAT 蛋白會抑制 β -catenin/TCF 與其下游基因之啟動子結合，使 β -catenin/TCF 無法活化其下游基因之轉錄表現。

(二) *HBPI* 抑癌基因之結構與功能

HBPI 基因，全名為 high mobility group (HMG) transcription factor 1，位於染色體 7q31 的區域，全長約 33kb，包含 11 個 exons，可轉譯出一段 514 個胺基酸的蛋白質 (Fig. 4)，包含了四個具有功能的區域，分別為 RB interaction domain (18, 19)、p38 MAPK interaction domain (20)、Repression domain (21) 和 C 端的 HMG box。其中 HMG box 具有與 DNA 結合的特性，因此 HBPI 的功能為轉錄因子；RB interaction domain 與 RB 結合後會抑制細胞週期的進行並調控細胞的分化；p38 MAPK interaction domain 則會被 p38 MAPK 結合而抑制 HBPI 下游基因 *cyclin D1* 的轉錄活性，因此抑制細胞週期的進行；而 repression domain 會與 TCF 結合，而抑制 TCF 所調控基因的轉錄活性。上述的 4 種區域在其它能引起 protein-protein interaction 的蛋白質中都有存在，因此推測它們具有蛋白質交互作用的功能 (protein-protein interaction)。

三、*ICAT*、*HBPI* 基因異常與癌症形成的相關報導

(一)*ICAT*、*HBPI* 基因/蛋白在其他癌症之異常情形

有許多文獻指出，*ICAT* 基因位於染色體 1p36.2 的區域，此染色體區域在許多癌症中均發現常有基因座缺失 Loss of heterozygosity (LOH) 的情形，包括：神經母細胞瘤 (neuroblastoma)、大腸直腸癌 (colorectal cancer)、乳癌 (breast cancer) 及肝癌 (hepatocellular carcinoma) (22-25)。另外也有研究指出，*ICAT* 會抑制 *APC* 及 β -catenin 突變的大腸直腸癌細胞增生和 *Axin* 突變的肝癌細胞的增生，研究中亦發現 *ICAT* 會抑制 G2-M 調控蛋白的表現，即抑制 Cdc2 去磷酸化以及 cyclin B1 進入細胞核，因此推論，*ICAT* 抑制大腸直腸癌細胞增生的機制是引發細胞 G2/M arrest，接著細胞死亡 (apoptosis) (26)。另外，在黑色素瘤 (malignant melanomas) 的研究中發現，*ICAT* 基因位於染色體 1p36 的區域有 40% LOH 的頻率發生，而 *ICAT* mRNA 也有 78% 的低表達情形 (27)。

目前已有一些研究顯示 *HBPI* 基因可能為抑癌基因，*HBPI* 基因位於染色體 7q31.1 的位置，而此區域常在癌症中發現有基因座缺失或染色體易位 (chromosomal translocation) 的情形，例如：卵巢癌 (ovarian cancer) (28, 29)、前列腺癌 (prostate carcinomas) (30)、乳癌 (31)、鱗狀細胞癌、結腸癌 (32)、急性骨髓性白血病 (33) 中均發現

有基因缺失的情形。在脂肪及肌肉細胞中發現，HBPI 會抑制 G1 progression (34) 並會阻斷 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑 (35)，因此可能形成癌症。在乳癌細胞的研究中，發現 HBPI 失去功能與乳癌細胞的轉移 (invasive) 有正相關，而在轉移的病例中有 30% 的 HBPI 突變發生 (36)。

(二) *ICAT*、*HBPI* 基因/蛋白在肺癌之異常情形

本實驗室先前基因體缺失的研究中，使用 *ICAT* 基因的 microsatellite marker *DIS1612* 和 *DIS1597* 以及 *HBPI* 基因的 microsatellite marker *D7S1818* 和 *D7S820*，偵測到台灣非小細胞肺癌病人 *ICAT* 和 *HBPI* 發生 41% 和 17% 的基因異質性喪失 (37)。文獻中目前尚未有完整分析 *ICAT* 和 *HBPI* 此兩基因在肺癌細胞中 DNA、mRNA 和 protein 層面的研究，希望藉由此次研究建立參與 Wnt/ β -catenin 訊號傳遞途徑中的兩個成員-*ICAT* 和 *HBPI* 在台灣肺癌形成之機制和角色，並探討 *ICAT* 和 *HBPI* 基因變異是否與肺癌細胞中 β -catenin 下游基因轉錄過度活化有相關性。

肆、研究目標

本研究主要探討參與 wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑基因 *ICAT* 及 *HBPI* 之變異與台灣地區非小細胞肺癌形成之機制。

1. 探討台灣地區肺癌病人 *ICAT* 和 *HBPI* 基因/蛋白變異情形 (蛋白質表現、mRNA 表現及啟動子高度甲基化情形)，並探討各種變異機制及其之間的相關性。
2. 探討 *ICAT* 和 *HBPI* 基因/蛋白變異狀況和肺癌病人臨床病歷資料 (如性別、年齡、抽煙習慣、癌症種類、癌症分期、存活率) 之間的相關性。
3. 探討台灣地區肺癌病人 *ICAT*、*HBPI* 異常與 β -catenin 蛋白轉錄活化 (例如 β -catenin 對於下游基因轉錄活性影響) 間之相關性。
4. 將細胞株以去甲基化藥物 5'-aza-2'-dC 處理，以探討 *ICAT* 及 *HBPI* mRNA 重新表現結果的變化，及其對 β -catenin 蛋白轉錄功能抑制之相關性。

伍、方法總論

一、研究材料

檢體來源及病歷資料

95 個肺癌檢體來自臺北榮總胸腔外科，其中多是屬於非小細胞肺腫瘤 (non-small cell lung cancer, NSCLC)，檢體包括 54 個肺腺癌 (Adenocarcinoma, AD) 病人、34 個鱗狀上皮細胞肺癌 (Squamous carcinoma, SQ) 病人，少部分為 AD、SQ 混合型或大細胞肺癌 (Large cell carcinoma, LC)。肺癌種類以及期數是根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 分類方法及 TNM system (T=primary Tumor；N=Regional Lymph Node；M=Distant Metastasis) 所分類。病歷資料尚包括病人的抽煙狀態：分為吸煙及沒吸煙族群，前者包含目前仍吸煙及已戒煙兩群人。外科手術之後追蹤調查其預後的情形，為第一年每兩個月追蹤調查一次，之後每三個月調查一次，追蹤至 2006 年 11 月，而所有病人的平均追蹤期為 29 個月 (分佈為 2 至 53 個月)，其中至追蹤期結束仍存活的 80 位病人，其平均追蹤期為 31 個月 (分佈為 2 至 53 個月)；至追蹤期結束已死亡的 15 位病人，其平均追蹤期為 18.5 個月 (分佈為 4 至 42 個月)。

二、 β -Catenin、ICAT 與 HBP1 蛋白表現分析

1. 免疫組織染色分析 (Immunohistochemistry assay, IHC)

95 個病人樣本經福馬林浸潤，包埋在石蠟的 5 μ m 的肺癌組織切片，經 xylene 脫蠟及酒精復水後，用 primary antibody (分析濃度及廠牌見 **Table 1**) 偵測蛋白表現，再使用 Biotinylated secondary antibody (DAKO LSAB kit K0675, DAKO, Carpinteria, CA, USA) 和 primary antibody 結合，再接以 streptavidin-horseradish peroxidase，此過氧化氫酶會與 3-amino-9-ethylcarbazole containing hydrogen peroxide, AEC+Substrate-Chromogen 受質反應而呈色，使染色具有放大的效果，最後切片再經 hematoxylin (DAKO) 染色，使背景呈色，即以 mounting solution (ZYMED, San Francisco, CA, USA) 進行封片。

2. 染色切片之判讀標準

染色後的判讀標準：(a) 在癌組織中，細胞核沒有紅褐色反應，但其周圍之正常細胞，細胞核有紅褐色反應 (internal control)，則稱為 negative expression；(b) 在癌組織中，細胞核有紅褐色反應，則為 positive expression。經由與其他文獻 (38) 及實驗資料做一比對，所訂定出的判讀標準為：

β -Catenin：為多功能蛋白，可分佈在細胞膜、質、核，因為 β -catenin

在細胞核中過度的表現會活化其下游基因表現，我們主要觀察 β -catenin 在細胞核表現，若大於 60% 細胞核有褐色反應，則歸為 β -catenin 不正常累積之病人。

ICAT：為細胞核蛋白，若 <40% 癌細胞核有紅褐色反應，則歸為 ICAT 低表達病人；>40% 癌細胞有紅褐色反應，則歸為正常表達病人。

HBPI：為細胞核蛋白，若 <40% 癌細胞核有紅褐色反應，則歸為 HBPI 低表達病人；>40% 癌細胞有紅褐色反應，則歸為正常表達病人。

三、ICAT 與 HBPI 基因 mRNA 分析

1. mRNA 萃取

95 個癌組織樣本經外科手術切除癌組織塊及鄰近正常組織塊之後，以液態氮急速冷凍，mRNA 的萃取則是將組織塊由液態氮取出搗碎磨成粉之後，利用 TRIZOL 溶液 (GIBCO BRL, Life Technology, USA) 萃取，而 RNA 的濃度及純度則分別以吸光值 A_{260} 及 $A_{260/280}$ 的比值 (1.8-2.0) 推算出來。

2. 反轉錄-聚合酵素連鎖反應 (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

由病人之正常細胞與肺癌組織塊所萃取出之 mRNA，經反轉錄酶素反應 (Reverse transcriptase reaction, RT) 後製成 cDNA，其過程為：總反應體積為 20 μ l，包括 50 unit 之 SuperSCRIPT™ 反轉錄酶素 (Gibco)、4 μ l 的 5 倍緩衝溶液、2.5 μ g 之 RNA、0.2 μ g 之 oligo dT 引子和 0.1mM 之 dNTP。此反應物於 70°C 加熱 10 分鐘後，置於 42°C 反應 50 分鐘，再以 70°C 加熱 10 分鐘，最後加入 80 μ l 去離子水 (ddH₂O)，保存於 -20°C。*ICAT*、*HBPI*、*MMP7* 基因 mRNA 表現程度即是以 cDNA 進行 PCR，並佐以 *GAPDH* 基因之 mRNA 表現程度做為 internal control，其值當作此檢體基因表現的基準值，來計算所欲偵測基因片段的基因表現相對值，再算出所欲偵測之基因其 cDNA 表現量，藉此偵測 *ICAT*、*HBPI*、*MMP7* 基因 mRNA 表現情形。PCR 產物總體積為 25 μ l，其中包含 1 μ l cDNA、10xPCR buffer (Takara)、0.2mM dNTP、10 pmol PCR 引子和 0.1 μ l *Taq* (Takara)，PCR 引子設計 (Table 2) 和反應條件如下：

***ICAT*-cDNA**：95°C、5 分鐘將雙股 DNA 打開，接下來做下列步驟 32

個循環：Denature 溫度 95°C、30 秒，引子黏合溫度值 (T_m 值) 65°C、30 秒，Extension 溫度 72°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

***HBPI*-cDNA**：95°C、5 分鐘將雙股 DNA 打開，接下來做下列步驟 35

個循環：Denature 溫度 95°C、30 秒，引子 Tm 值 60°C、30 秒，Extension 溫度 72°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

MMP7-cDNA：95°C、5 分鐘將雙股 DNA 打開，接下來做下列步驟

35 個循環：Denature 溫度 95°C、30 秒，引子 Tm 值 60°C、30 秒，Extension 溫度 72°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應

GAPDH-cDNA：95°C、5 分鐘將雙股 DNA 打開，接下來做下列步驟

30 個循環：Denature 溫度 95°C、30 秒，引子 Tm 值 55°C、30 秒，Extension 溫度 72°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

反應完成之 PCR 產物以 1.5% 洋菜膠進行電泳，並以 ethidium bromide 染色 10 分鐘，最後以紫外光顯影照相分析儀定量 cDNA 強度之 Integrated Density Value (IDV 值)。

3. 判讀標準

每個檢體之正常細胞和肺癌細胞的 *ICAT*、*HBPI*、*MMP7* cDNA 強度 (IDV 值)，以 *GAPDH* cDNA 強度 (IDV 值) 校正後，再將肺癌細胞與正常細胞相比，若相比之後，肺癌細胞/正常細胞之值小於 0.5，

則判定為低度表達 (39)。

四、*ICAT*、*HBPI* 基因啟動子過度甲基化分析

1.DNA 萃取

95 個肺癌組織樣本之組織塊及鄰近正常組織，在液態氮中分別搗碎磨成粉後，加入 800 μ l lysis buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.4%SDS and 0.4mg/ml proteinase K)，水浴 56 $^{\circ}$ C，2-3 小時後，以 phenol-chloroform 萃取出上清液。依次加入 RNase (40 μ g/ml)，56 $^{\circ}$ C，45 分鐘；proteinase K (0.2 mg/ml) 及 SDS (0.1%)，56 $^{\circ}$ C，45 分鐘後，利用 phenol-chloroform 以及酒精沉澱的步驟純化出 DNA，每管樣本以 50 μ l 的無菌水溶解，存放在-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存備用。

2.Methylation-specific PCR, MSP assay

將 DNA 用 sodium bisulfite 處理 16 小時之後，若此 DNA 之 CpG islands 沒有甲基化，則 cytosines 便會轉變為 uracil；反之，若此 DNA 之 CpG island 有甲基化的話，則 cytosines 便不會轉變為 uracil；因此，經過 sodium bisulfite 處理的甲基化與沒有甲基化之 DNA 序列是不同的，利用設計不同之引子 (**Table 2**) 來增量甲基化及沒有甲基化之 DNA，以判讀啟動子是否有過度甲基化的情形。PCR 產物總體積為

25 μ l，其中包含 6 μ l DNA，Gold 10XPCR buffer，2.5mM 的 MgCl₂，2.5mM dNTP，10 μ mol PCR 引子和 0.2 μ l 的 AmpliTaq polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ)，PCR 反應條件如下：

ICAT-methyl-U：95°C、10 分鐘，再經 40 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 57°C、30 秒，72°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

ICAT-methyl-M：95°C、10 分鐘，再經 40 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 55°C、30 秒，72°C、30 秒，之後再經 35 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 58°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

HBPI-methyl-U：95°C、10 分鐘，再經 35 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 55°C、30 秒，72°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

HBPI-methyl-M：95°C、10 分鐘，再經 20 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 65°C、30 秒，72°C、30 秒，之後再經 30 個循環：95°C、30 秒，Tm 值 70°C、30 秒，最後 72°C、10 分鐘結束反應。

3.判讀標準：

若在設計增量有甲基化之引子得到 PCR 產物多於未甲基化的，

則判定此病人啟動子有甲基化情形發生 (39)。

五、細胞處以去甲基化藥物 5'-aza-2'-deoxycytidine (5'-Aza-2'-dC) 之 相關分析

1.細胞培養

將肺癌細胞株 CL1-5 及 CL1-5-F4 以培養基 DMEM 培養於 37°C、5%CO₂ 培養箱中；細胞株以倒立式顯微鏡觀察，當細胞長滿為單層 (monolayer) 時，即可進行繼代培養 (subculture)。在無菌操作台 (laminar flow) 內，以抽氣機吸去上層液，再以 5 ml phosphate-buffered saline (PBS) 清洗細胞兩次，吸去 PBS 並加 1 倍 trypsin-EDTA 1ml，前後左右搖晃培養皿使 trypsin 均勻分散於細胞層，並置於培養箱中約 2~3 分鐘後，搖晃培養皿同時以倒立式顯微鏡觀察，待細胞層脫落並浮起時，取適當比例的細胞於新的培養基中 (至總體積 8ml)，以十字型搖散細胞，培養在 37°C，5% CO₂ 培養箱中；待 2-3 天細胞株長滿培養皿後，即可再行繼代培養。

2.細胞加藥處理

本研究以去甲基化藥物 5'-Aza-2'-dC 處理肺癌細胞株 CL1-5 及 CL1-5-F4。於加藥的前一天取 1×10^6 細胞種於 10cm 細胞培養基中培

養，隔天加入5 μ M的去甲基化藥物5'-Aza-2'-dC處理細胞，之後在繼代培養時同時加入5 μ M的去甲基化藥物5'-Aza-2'-dC處理細胞至少3細胞代數 (cell doubling)。處理指定時間後，每盤細胞分別抽出RNA及DNA以做分析。

3.細胞株DNA及mRNA的抽取、定量及分析

使用 QIAamp DNA Mini Kit 抽取細胞株的 DNA，首先將培養皿上的 DMEM 吸乾，拿刮杓將細胞刮至乾淨的 eppendorf 中，加入 20 μ l Proteinase K 及 200 μ l Buffer AL，水浴 56 $^{\circ}$ C，10 分鐘後加入 200 μ l 99.9% 酒精，將所有檢體放入 QIAamp spin column，離心 8000 rpm 1 分鐘，之後再分別加入 500 μ l Buffer AW1 及 AW2，離心後，需將 column 下收集管內的 buffer 移除，最後將 QIAamp spin column 置於乾淨的 eppendorf 上，並加入 200 μ l Buffer AE 於室溫下 1 分鐘，離心、收集 DNA 定量備用。

細胞株 DNA 分析採用 MSP 方法，與「方法四」中基因啟動子高度甲基化分析相同。至於細胞株 mRNA 的抽取、定量及 RT-PCR 方法則與「方法三」中基因 mRNA 分析相同。

六、統計分析

以分析的結果將病人區分為變異組與正常組，利用 Pearson χ^2 test，分析 95 個肺癌病人其 *ICAT* 及 *HBPI* 啟動子過度甲基化、mRNA 之表現情形及蛋白異常表現與各種病理分類（包含性別、年齡、癌症種類、癌症分期、抽煙狀況）關係的統計分析。其中癌症分期之 Stage I、II 定義為較早期的病人族群，Stage III、IV 定義為較晚期的病人族群；而抽煙狀況則分為有抽煙和沒抽煙兩個族群，有抽煙者包含目前仍在抽煙和已戒煙者，所有分析作業均以 SPSS (11.0 版) 軟體進行。預後分析方面，利用 Kaplan-Meier 方法，以時間和存活率分別為橫、縱軸而計算出 median survival time (40)；Life test 則用以計算兩群體間存活的差異性。

陸、結果

一、探討臺灣地區肺癌病人 *ICAT* 基因/蛋白之變異情形

(一) *ICAT* 蛋白表達情形與病歷資料相關性

利用免疫組織染色法，分析 95 位 NSCLC 病人的癌組織切片之 *ICAT* 蛋白表現，染色代表圖見 (Fig. 5A-D)。實驗結果顯示：在分析的 95 個檢體中，有 26% (25/95) 的病人，其癌組織切片之癌細胞的細胞核褐色反應小於 40%，判定為 *ICAT* 蛋白低表達或不表達的病人；另外在病歷資料分析方面，發現 *ICAT* 蛋白低表達或不表達的情形，與病人之性別、年齡、抽煙狀況、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性 ($P>0.05$) (Table 3)。

(二) *ICAT* mRNA 表達情形與病歷資料相關性

利用 RT-PCR 方法，分析 95 位 NSCLC 病人癌組織及其鄰近正常組織 *ICAT* mRNA 表達情形，引子所夾的區域為 exon3 至 exon6，全長為 347bp，RT-PCR 代表圖見 (Fig. 6A)。實驗結果顯示：在檢驗中的 95 個檢體中，有 37.9% (36/95) 的病人，其癌組織 mRNA 表現比正常細胞降低一半以上；另外在病歷資料分析方面，發現 *ICAT* mRNA 低表達或不表達的情形，與病人之性別、年齡、抽煙狀況、癌症種類、

癌症分期間並無明顯相關性 ($P>0.05$) (**Table 3**)。值得注意的是，*ICAT* 基因 mRNA 低表達之肺癌病人其存活率有較 *ICAT* mRNA 正常表達者顯著的下降 ($P=0.025$) (**Fig. 7A**)；另外，*ICAT* mRNA 低表達之肺腺癌病人其存活率亦有較 *ICAT* 正常表達者顯著的下降 ($P=0.048$) (**Fig. 7B**)

(三) *ICAT* 基因啟動子過度甲基化情形與病歷資料相關性

利用設計不同之引子來增量甲基化及沒有甲基化之 DNA，甲基化引子所夾長度為 114bp (-664~-777bp)，沒有甲基化引子所夾長度為 125bp (-656~-780bp)，MSP 代表圖見 (**Fig. 8A**)。實驗結果顯示：在分析的 95 位病人中，有 36.8% (35/95) 病人的 *ICAT* 基因啟動子有過度甲基化的情形，另外在病歷資料分析方面，發現 *ICAT* 啟動子高度甲基化情形，與病人之年齡、抽煙狀況、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性存在 ($P>0.05$)；但值得注意的是，在性別方面，女性的 *ICAT* 基因啟動子甲基化情形有高於男性的趨勢 ($P=0.058$) (**Table 3**)。

(四) *ICAT* mRNA、蛋白不表達與啟動子甲基化間之相關性

利用 Pearson χ^2 test 分析 *ICAT* mRNA、蛋白不表達與啟動子甲基化之間的相關性 (**Fig. 9A**)。首先分析 *ICAT* mRNA 與蛋白表達間的相關性，結果 mRNA 有表達/蛋白亦有表達，與 mRNA 低表達/蛋白亦

低表達的病人佔全部之 73.7% (70/95)，且達顯著相關 ($P < 0.001$)；而在啟動子甲基化與否和 mRNA 表達情形方面，發現啟動子過度甲基化/mRNA 低表達，與啟動子沒有過度甲基化/mRNA 有表達的病人佔全部之 63% (60/95)，二者間達顯著相關性 ($P = 0.038$)；至於啟動子過度甲基化和蛋白表達之間並無明顯相關性存在 ($P > 0.05$)。

二、探討臺灣地區肺癌病人 *HBPI* 基因/蛋白之變異情形

(一) *HBPI* 蛋白表達情形與病歷資料相關性

利用免疫組織染色法，分析 95 位 NSCLC 病人的癌組織切片之 *HBPI* 蛋白表現，染色代表圖見(Fig. 5E-H)。實驗結果顯示：在分析的 95 個檢體中，有 31.6% (30/95) 的病人，其癌組織切片之癌細胞的細胞核褐色反應小於 40%，判定為 *HBPI* 蛋白低表達或不表達的病人；另外在病歷資料分析方面，發現 *HBPI* 蛋白低表達或不表達的情形，與病人之性別、年齡、抽煙狀況、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性存在 ($P > 0.05$) (Table 4)。

(二) *HBPI* mRNA 表達情形與病歷資料相關性

利用 RT-PCR 方法，分析 95 位 NSCLC 病人癌組織及其鄰近正常組織 *HBPI* mRNA 表達情形，引子所夾的區域為 exon9 至 exon11，

全長為 396bp，RT-PCR 代表圖見(Fig. 6B)。實驗結果顯示：在檢驗中的 95 個檢體中，有 33.7% (32/95) 的病人，其癌組織 mRNA 表現比正常細胞降低一半以上；另外在病歷資料分析方面，發現 *HBPI* mRNA 低表達或不表達的情形，與病人之性別、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性 ($P>0.05$)。但值得注意的是，有抽煙習慣病人中，*HBPI* mRNA 低表達頻率高於未抽菸的病人 ($P=0.035$)；在癌症種類方面，發現在鱗狀上皮細胞肺癌病人中，*HBPI* mRNA 低表達頻率也高於腺肺癌病人 ($P=0.021$) (Table 4)。

(三) *HBPI* 基因啟動子過度甲基化情形與病歷資料相關性

利用設計不同之引子來增量甲基化及沒有甲基化之 DNA，甲基化引子所夾長度為 222bp (-153~69bp)，沒有甲基化引子所夾長度為 223bp (-153~70bp)，MSP 代表圖見 (Fig. 8B)。實驗結果顯示：在分析的 95 位病人中，有 45.3% (43/95) 病人的 *HBPI* 基因啟動子有過度甲基化的情形，另外在病歷資料分析方面，發現 *HBPI* 啟動子高度甲基化情形，與病人之性別、年齡、抽煙狀況、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性存在 ($P>0.05$) (Table 4)。

(四) *HBPI* mRNA、蛋白不表達與啟動子甲基化間之相關性

利用 Pearson χ^2 test 分析 *HBPI* mRNA、蛋白不表達與啟動子甲

基化之間的相關性 (**Fig. 9B**)。首先分析 *HBPI* mRNA 與蛋白表達間的相關性，結果 mRNA 有表達/蛋白亦有表達，與 mRNA 低表達/蛋白亦低表達的病人佔全部之 68% (65/95)，二者間達顯著相關性 ($P=0.006$)；啟動子甲基化與否和 mRNA 表達情形相符合者佔 63% (60/95)，且達顯著相關 ($P=0.016$)；而啟動子甲基化與否和蛋白表達情形相符合者佔 61% (58/95)，且達顯著相關 ($P=0.05$)。

三、探討臺灣地區肺癌病人 β -catenin 蛋白及其下游基因 *MMP7* 之變異情形

利用免疫組織染色法，分析 95 位 NSCLC 病人的癌組織切片之 β -catenin 蛋白表現，染色代表圖見 (**Fig. 5I-L**)。實驗結果顯示：在分析的 95 個檢體中，有 42% (40/95) 的病人，其癌組織切片之癌細胞的細胞核褐色反應大於 60%，判定為 β -catenin 蛋白在細胞核過度表達的病人。另外在病歷資料分析方面，發現 β -catenin 蛋白過度表達的情形，與病人之性別、年齡、抽煙狀況、癌症種類、癌症分期間並無明顯相關性 ($P>0.05$) (**Table 5**)。在分析的 50 位病人中， β -catenin 蛋白過度表現的有 26 位，其中 *HBPI* 蛋白低表達的有 10 位，再檢查 β -catenin 蛋白下游基因 *MMP7* (**Fig. 6C**) 之表現，其中有 8 位 (80%) 其 *MMP7* 基因為過度表達的情形 (**Table 6**)。

四、細胞以去甲基化藥物 5'-aza-2'-deoxycytidine (5'-Aza-2'-dC) 之

處理結果

5'-Aza-2'-dC 為 cytosine 的類似物，在細胞進行複製時，會鑲嵌到 DNA 中取代 cytosine，使所有的 cytosine 都呈現沒有甲基化現象。我們將原本為 *HPBI* 過度甲基化及 mRNA 低表達之 CL1-5 細胞處理 5'-Aza-2'-dC (5 μ M, 3 細胞代數)，觀察當 *HPBI* 基因啟動子去甲基化之後，對 *HPBI* 基因的 mRNA 的表現影響如何？研究結果顯示：當細胞處以 5'-Aza-2'-dC 之後，會使 CL1-5 細胞株的 *HPBI* 基因啟動子去甲基化 (**Fig. 10A**)，且伴隨者 *HPBI* mRNA 表現量上升 (**Fig. 10B**)。因此我們推論：*HPBI* 基因啟動子甲基化確實會對其 mRNA 的表現造成重要的影響。

柒、討論

肺癌在國內為十大癌症死亡原因之一，且有逐年增加的趨勢。根據衛生署最新統計，肺癌在國人癌症排行中，男性居第二，女性居首位 (1)。由於肺癌難以早期偵測，開刀成功率或化療效果皆不理想，而預後情況差，通常診斷發現時已屆末期，導致死亡率偏高。而肺部是一個與空氣直接接觸的臟器，一些空氣污染物容易進入肺臟，再加上許多肺癌患者有抽煙或接觸環境中致癌因子的情形，如果長期受到致癌因子的刺激，可能直接或間接的啟動一些訊號傳遞路徑，而造成細胞無限制的增生與擴散，就可能導致癌細胞的形成。

在許多文獻中已知，Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑主要參與胚胎發育過程及癌症的形成 (12, 41)。如果 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中的基因發生變異，形成癌症的機率將會非常高，因此，研究 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中的基因在肺癌患者中的變異情形，是非常重要之課題。近年來，探討 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑與癌症之間相關性，主要是研究分解 β -catenin 蛋白機制有關成員的變異情形，若調控 β -catenin 分解的蛋白質發生變異，會導致 β -catenin 蛋白在細胞核中不正常的累積，而形成癌症。例如：在大腸直腸癌細胞中常觀察到有 *APC* 抑癌基因的突變 (42)；*Axin* 突變則可能造成肝癌發生 (43)。

由於文獻顯示 β -catenin 蛋白會和 TCF 蛋白結合共同活化一些會

引發癌症的基因，例如：*c-jun*、*c-myc*、*cyclin D1* 及 *MMP7* (13, 14)。

在細胞核中 ICAT 及 HBP1 蛋白分別會與 β -catenin 蛋白及 TCF 蛋白結合，而減少 β -catenin 蛋白和 TCF 蛋白結合，因此無法活化其下游基因。因此，本研究主要是探討位於細胞核中，會拮抗 β -catenin 蛋白與 TCF 轉錄因子之間轉錄活化功能的兩個蛋白質 ICAT 和 HBP1 的變異情形。我們針對 95 位台灣 NSCLC 病人的 *ICAT* 與 *HBP1* 基因之啟動子甲基化、mRNA 以及蛋白質表現做一完整的探討，並且和 β -catenin/TCF 下游目標基因 *MMP7* mRNA 表現與病人病歷資料做統計分析。

目前已知，在肺癌病人中 *ICAT* 基因所在的染色體 1p36.2 位置有很高的 LOH 頻率 (37, 44)，但對於 *ICAT* 基因變異在肺癌中的重要性則未有文獻報導。本研究結果顯示，在 95 位病人中，有 26% 的 *ICAT* 蛋白質表現降低；在 RNA 層面，有 37.9% 的癌組織 mRNA 表現量比正常組織降低了一半以上；在 DNA 層面，有 36.8% 的 *ICAT* 基因啟動子有高度甲基化情形，且多發生在女性，具有達邊緣統計相關。我們將 *ICAT* 基因、mRNA 及蛋白質表現做統計分析，發現 *ICAT* 基因之蛋白質與 mRNA 之間的表現呈統計上顯著性，而 *ICAT* mRNA 低表現與其啟動子過度甲基化之間也呈統計上顯著性。由此可知，*ICAT* 啟動子甲基化與否可能會影響其轉錄調控作用。未來將以甲基酵素抑

制劑處理的細胞模式來證實 ICAT 基因不表現之主要機制為啟動子過度甲基化。至於 *ICAT* mRNA 低表達者在肺癌病人有較差的存活率，未來此存活率分析可針對肺癌病人做一個大規模研究，以確定 *ICAT* 低表達者是否可以作為肺癌臨床應用性的存活率分子指標。

在 *HBPI* 基因方面，有 31.6% 的蛋白質表現降低，且多發生在鱗狀上皮細胞肺癌的病人；而有 33.7% 的癌組織中其 mRNA 表現量比正常組織降低一半以上，且 mRNA 低表達情形通常發生在有抽菸習慣及鱗狀上皮細胞肺癌的病人；有 45.3% 其啟動子有甲基的現象。我們將 *HBPI* 基因、mRNA 及蛋白質表現做統計分析，結果顯示 *HBPI* 蛋白、mRNA 和啟動子甲基化三者之間具有相當高的一致性。因此，*HBPI* 基因啟動子甲基化與否可能會影響其轉錄調控作用。去甲基化藥物 5'-Aza-2'-dC 處理肺癌細胞株 CL1-5 的研究結果發現：當 CL1-5 以 5'-Aza-2'-dC 去甲基化藥物處理之後，*HBPI* 基因的 mRNA 表現量會上升。因此我們推論，肺癌病人中，*HBPI* 基因啟動子的甲基化與否，確實會對其 mRNA 的表現造成影響。

另外，本研究將 Wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑中，*ICAT* 及 *HBPI* 蛋白分析，結果顯示：在 95 位病人中，此兩蛋白同時發生變異的只有 6 位，但 *ICAT* 和 *HBPI* 任一蛋白質有不正常表現（低表達）的情形則有 49 人 (51.6%)。此結果顯示，這兩個抑癌基因對於肺癌的形

成具有相當的重要性，只要一個基因發生變異，可能就會造成 Wnt/ β -catenin 訊號傳遞路徑的異常活化而導致癌症發生。在臨床病理資料的分析方面，顯示 *ICAT* 低表現與肺腺癌病人的存活率有關，而 *HBPI* 基因變異則較好發於鱗狀上皮細胞肺癌的病人，顯示此二基因分別在二個主要的肺癌次形式癌症佔有一重要角色。

本研究亦分析了 β -catenin/TCF 的下游目標基因 *MMP7* 的變異情形，在分析的 50 位病人中，發現 β -catenin 蛋白與 *MMP7* mRNA 同時過度表達或同時正常表現者有相當高的一致性。而這 50 位病人中有 26 人有 β -catenin 蛋白過度活化的現象，其中有 10 人有 *HBPI* 蛋白低表達情形，再分析 β -catenin 蛋白下游基因 *MMP7* 的表現，發現有 80% (8/10) 的病人有 *MMP7* mRNA 低表達情形，結果顯示 *HBPI* 蛋白的變異，的確會失去對 β -catenin/TCF 的調控作用而活化其下游基因 *MMP7*，而造成細胞無限制的增生與擴散，就可能導致癌細胞的形成。

捌、結論及研究應用與未來工作

結論：Wnt β -catenin 訊息傳遞路徑基因 β -catenin、*ICAT* 和 *HBPI* 在台灣非小細胞肺癌形成中扮演重要角色。當 β -catenin 蛋白大量在細胞核中累積，*ICAT* 或 *HBPI* 蛋白若發生變異（主要由啟動子過度甲基化）而失去其抑制 β -catenin/TCF 的活化轉錄功能，可能是造成肺癌形成的重要原因。

未來工作：

1. 持續完成 CL1-5-F4 細胞處理 5'-Aza-2'-dC 後，觀察當 *ICAT* 基因啟動子去甲基化之後，對 *ICAT* 基因的 mRNA 的表現影響如何？
2. 利用 siRNA 的方法在細胞模式中研究 *ICAT* 和 *HBPI* 蛋白拮抗 β -catenin/TCF 轉錄活化的影響。

目前我們只針對 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中的 *ICAT* 和 *HBPI* 做分析，但是由於 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中基因並不止於這兩者，且癌症形成牽涉許多基因的變異，因此我們未來還需要將參與 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中基因（如：*Wif-1*、*Gsk-3 β* 、*Dvl* 和 *APC*... 等）做更深入的探討。