

柒. 討論

由於肺癌因為難以早期偵測、開刀成功率或化療效性皆不理想，導致死亡率偏高，又鑒於肺是一個會直接接觸空氣中物質的臟器，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，也可能造成肺細胞發生 DNA 雙股斷裂，倘若 DSBs 修補基因又有變異，形成癌症的機率非常高，因此研究 DSBs 修補基因在肺癌患者中的變異情形，是非常重要的課題。

自從 1994、1995 年相繼發現乳癌相關基因 *BRCA1* 和 *BRCA2* 以來，一般都認為它們參與了女性乳癌和卵巢癌，*BRCA1* 和 *BRCA2* 發生突變、或是基因異質性喪失、啟動子高度甲基化造成蛋白不表現時，與乳癌和卵巢癌發生息息相關，經過十年的研究，在這二種癌症上，*BRCA1*、*BRCA2* 已被研究得非常透徹。許多研究證實 *BRCA1* 和 *BRCA2* 這二個基因參與細胞週期的調控、染色體重新塑造、轉錄因子調控和 DNA 修補機制中 HR 路徑，由於它們是如此的多才多藝，因此也被認定為抑癌基因。既然它們有這麼多的功能，但是在肺癌卻很少被研究，2001 年美國科學家發現 12.5% 肺癌病人 *BRCA2* 基因發生 LOH，但他們使用的 D13S267 marker 並不是座落於 *BRCA2* 基因內，且其實驗對象為西方人，與台灣人的族群變異度可能很大。其次，

2000 年英國實驗室，偵測 NSCLC 病人之 *BRCA2* LOH 頻率，發現 70% 的病人發生 LOH，頻率相當的高，但是當時其使用的 D13S171 marker，現已證實並非在 *BRCA2* 基因座內，而是另一個新的基因 *AS3* (141)，因此其資料並不可信賴。2003 年德國科學家研究一位有乳癌家族遺傳病史，並帶有多重癌症的肺癌病患，*BRCA2* 發生突變和 LOH，但其樣本數只有一位，對於實驗的客觀性並不足夠。

因此，本研究針對 87 位台灣 NSCLC 病人的 DSBs 修補基因中，HR 修補路徑中 *BRCA1* 和 *BRCA2* 基因之 DNA、RNA 和蛋白質層面做一完整的探討，這同時也是第一篇同時研究 *BRCA1* 和 *BRCA2* 與肺癌形成相關的報導。

在 *BRCA1* 蛋白質層面分析，87 位病人中，有 25 人 (28.7%) 的 *BRCA1* 表現降低；在 RNA 層面，26 位病人 (29.9%) 的癌細胞 mRNA 表現比正常細胞降低了一半以上；同時我們分析了 *BRCA1* mRNA 和蛋白質表現情形，結果顯示有相當高的一致性，mRNA 有表達/蛋白質亦有表達，與 mRNA 低表達/蛋白質亦低表達的病人佔了 80.5% (70/87)，另外 mRNA 有表達而蛋白質低表達的有 8 人，推測這些檢體之 *BRCA1* 蛋白質轉譯後修飾作用發生問題，以致免疫組織染色時偵測不到其表現；再者，mRNA 不表達而蛋白質有表達的有 9 人，推測可能是二種實驗判讀標準或偵測時的敏感度有所不同而產生的誤差。文獻

報導中指出：*BRCA1* 有一些選擇性轉錄編輯情形發生 (97, 142-145)，而在本研究中選用偵測 exon 5 的引子，但是在 87 位非小細胞肺癌病人中，並未偵測到其 exon 5 發生選擇性編輯情形。在 DNA 層面分析時，本研究分析 *BRCA1* 啟動子甲基化，發現 31% (27/87) 病人的 *BRCA1* 啟動子有高度甲基化情形，另外有 12 個檢體其啟動子有甲基化而蛋白卻也有表達，推測可能原因之一為甲基化狀態在腫瘤組織中的異質性，亦即腫瘤組織中，只有部分細胞的啟動子有甲基化，所以蛋白不表現，而另一部分的細胞啟動子沒有甲基化，因此蛋白有表現的情形；另一個可能原因為啟動子部分甲基化，及甲基化的情形只在啟動子的部分位置、或是只發生在其中一個 allele，而導致某些偵測到啟動子高度甲基化的病人，其蛋白也有表現的情形；此外，有 10 個檢體之蛋白質為低表達，而啟動子並沒有甲基化，推測導致這些病人的蛋白不表達原因應為甲基化以外之機制。在 *BRCA1* 基因座缺失分析方面，特地各選用二個位於 *BRCA1* 基因座內的微衛星標竿，以驗證此基因確實的 LOH 頻率，發現有效檢體中，26.3% 病人的 *BRCA1* 在至少一個 marker 中有發現 LOH 情形。另外，研究中發現：*BRCA1* 蛋白與 mRNA、啟動子甲基化三者之間具有相當高的一致性，但是與 LOH 的相關性並不顯著，推測其原因為：大部分抑癌基因必須二個 allele 都失去活性才會導致癌症形成；可能此基因的一個 allele 發生

LOH、另一個 allele 啟動子高度甲基化，抑或是二個 alleles 的啟動子發生甲基化情形所導致，因此在目前無法看到 BRCA1 蛋白、mRNA 和啟動子甲基化與 LOH 的相關性。再者，研究中發現有 7% (6/87) 病人同時偵測到 LOH 和啟動子甲基化，且其 BRCA1 蛋白確實屬於低表現或不表現者。

在 *BRCA2* 基因方面，在 DNA 層面，本研究分析 *BRCA2* 啟動子甲基化，發現 39.1% (34/87) 病人的 *BRCA2* 啟動子有高度甲基化情形，另外有 6 個檢體其啟動子有甲基化而 mRNA 卻也有表達，此外，有 4 個檢體之啟動子並沒有甲基化，但其 mRNA 卻為低表達。另外在 *BRCA2* 基因座缺失分析方面，本次實驗選用的二個 markers 確定是位在 *BRCA2* 基因座內，發現所分析的有效檢體中，44.9% 病人在至少一個 marker 中有發現 LOH 情形；在 RNA 層面，32 位病人 (36.8%) 的癌細胞 mRNA 表現比正常細胞低了一半以上；在選擇性轉錄編輯情形方面，文獻報導指出 *BRCA2* 有選擇性轉錄編輯情形 (98, 146-148)，而本實驗所使用的引子偵測其 exon 12 選擇性編輯，發現不論在肺癌病人癌組織和鄰近正常細胞均偵測到 exon 12 選擇性編輯產物，且其比例上來說並無明顯差異，推測此選擇性轉錄編輯產物對於肺癌形成的影響並不大，因此目前對於此產物的產生原因及其重要性尚未明瞭，須待進一步的分析研究。另外在蛋白質層面，發現

BRCA2 蛋白的表現有異於我們所認知的：核蛋白應該表現在細胞核內，在本研究中，使用了五家不同廠牌的抗體，卻無法偵測到 BRCA2 在細胞核內的表現，大部分有表達 BRCA2 的檢體，都是明顯的在細胞質有紅褐色呈現，而細胞核卻是呈現藍色（不表達）。因此查閱文獻發現，無獨有偶，蛋白質位置分佈錯誤的情形，在許多文獻中也被報導出來 (149-152)，研究亦證實，在不同組織中，BRCA2 蛋白表現在細胞質被偵測到，因此在排除抗體專一性不夠的因素下，認為本實驗檢查到 BRCA2 蛋白表現在細胞質的現象，很可能就是因為蛋白分佈錯誤的結果，但是實際情形仍須等待後續實驗，以其他更多的抗體來證實本實驗結果的正確性。由於目前的結果顯示：BRCA1 蛋白和 mRNA 的表現具有顯著的一致性，因而推論：BRCA2 蛋白和 mRNA 的表現應當也具有相當高的一致性存在，故目前暫以 BRCA2 mRNA 的表現情形當作蛋白質表現情形，與其他實驗資料做一比對。另外，研究中發現：BRCA2 mRNA 與啟動子甲基化之間具有相當高的一致性 ($P < 0.0001$)，但是 mRNA 和啟動子甲基化與 LOH 之間並無顯著相關性 ($P > 0.05$)。

自從 1981 年發現 XRCC5 以來，認為其與 Ku70、DNA-PK_{CS}、XRCC4 及 DNA ligase IV 共同參與了染色體重組中的 NHEJ 路徑，在免疫細胞的分化和發育上，NHEJ 在抗體多樣性的 V(D)J 重組作用亦

扮演極為重要的角色，經由 V(D)J 重組可產生多樣性的抗體和 T 細胞接受子以認識及對抗外來的抗原，因此，XRCC5 變異常與免疫相關疾病有關聯，如：Scleroderma-polymyositis overlap syndrome (153)。

另一方面，NHEJ 對於 DNA 雙股斷裂修補是非常重要的，XRCC5 又是 NHEJ 中第一個參與修補的蛋白，由此可知，XRCC5 在維持正常染色體的穩定性有極大的影響力。在文獻中指出 XRCC5 變異，也會造成一些疾病產生，有如維爾納氏症候群 (Werner's syndrome)，這種疾病由於基因體極度不穩定，使患者老化的速度比正常人快一倍，在十至三十歲左右就死亡 (154, 155)。近年來，一些國內外實驗室發現，XRCC5 變異與癌症形成也有相關，如乳癌、肝癌、胃癌...等 (123)。但是對於 XRCC5 與肺癌形成的文獻卻付之闕如，在本研究中，我們對於 87 位台灣 NSCLC 病人的 XRCC5 基因之 DNA、RNA 和蛋白質層面做一完整的探討，這同時也是第一篇研究 XRCC5 和肺癌形成相關的報導。

在蛋白質層面，87 位病人中，有 16 人 (18.4%) 的 XRCC5 表現降低，且 XRCC5 蛋白低表達病人與癌症種類為 SQ 的病人有關 ($P=0.031$)；在 RNA 層面，24 位病人 (27.6%) 的癌細胞 mRNA 表現比正常細胞低了一半以上，且 mRNA 表現降低情形通常發生在 SQ 的病人 ($P=0.044$)；同時我們分析了 XRCC5 mRNA 和蛋白質表現情形，

結果顯示有相當高的一致性，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了 77% (67/87)，另外 mRNA 有表達而蛋白低表達的有 6 人，推測其 mRNA 表現是在判讀標準低表達的臨界值附近，或是這些檢體之 XRCC5 蛋白轉譯後修飾作用發生問題，以致免疫組織染色時偵測不到其表現；再者，mRNA 不表達而蛋白有表達的有 14 人，推測可能是二種實驗判讀標準或偵測時的敏感度有所不同而產生的誤差。另外，在 DNA 層面，研究分析 XRCC5 啟動子甲基化，發現 21.8% (19/87)病人的 XRCC5 啟動子有高度甲基化情形，另外有 11 個檢體其啟動子有甲基化而蛋白卻也有表達，此外，有 8 個檢體之蛋白質為低表達，而啟動子並沒有甲基化情形。在 LOH 分析中，本研究特地選用位於 XRCC5 基因座內的微衛星標竿，以驗證此基因確實的 LOH 頻率，發現 37.3%病人發生 LOH；另外，研究中發現：XRCC5 蛋白與 mRNA、啟動子甲基化三者之間具有相當高的一致性，但是與 LOH 的相關性並不顯著。

最後，我們將 DSBs 修補系統中，所研究的三個基因做統整的分析，結果發現，單獨來看，此三基因於其 DNA、RNA 或蛋白質任一層面有變異者，在 *BRC1* 為 56.3% (49/87)，在 *BRC2* 為 64.4% (56/87)，在 *XRCC5* 為 50.6% (44/87)。顯示出：這些 DNA 雙股斷裂修補基因若發生變異，確實在台灣非小細胞肺癌形成中扮演重要角

色。並且，我們發現：在 87 位病人中，此三基因蛋白 (除 *BRCA2* 以 mRNA 計算)同時發生變異的只有 4 位，但若 *BRCA1/BRCA2/XRCC5* 任一基因的蛋白質 (除 *BRCA2* 以 mRNA 計算)有不正常表現 (低表達)的情形則有 54 人 (62.1%)；且 *BRCA1* 和 *BRCA2* mRNA 變異情形具有一致性，此結果顯示出 HR 與 NHEJ 在肺癌形成的關係上應屬於同一路徑，也就是說，這二個修補路徑對於肺癌形成均具有相當重要性，若是其中一路徑發生變異，就算另一修補路徑是正常、沒有變異情形發生，仍無法將斷裂的 DNA 修補完好，以致基因體不穩定性以及癌症的產生。

另一方面，針對 DNA 傷害反應，p53 蛋白誘發而表現上升情形，在本研究也有發現：我們發現 87 位非小細胞肺癌檢體中，46 人 (52.8%)的 p53 蛋白有過度表達情形。但是至於 p53 和 DSBs 修補基因之間的關係，仍是眾說紛紜，一般認為：當 DSBs 發生時，ATM 這個激酶首先被誘發，緊接著活化下游的 p53 和 DSBs 修補基因如 *BRCA1* 的表現，若身為 caretaker 的 DSBs 修補基因和身為 gatekeeper 的 p53 均發生變異，會導致癌症形成 (109, 112, 156, 157)。另一種說法認為：p53 和 DSBs 修補基因的表現有因果關係存在，譬如說當 *BRCA1* 失去功能時，會引發 p53 DNA damage response pathway，使 p53 表現上升 (158)；另有一研究證實：當 adriamycin 和 mitomycin C

這二種造成 DNA 傷害的藥劑存在下，p53 會抑制 *BRCA2* 啟動子，使 *BRCA2* mRNA 表現下降 (159)。因此目前對於 p53 和 DSBs 修補基因之間的關係，並不能做一個很明確的結論。