

第一章 文獻回顧

1-1 DNA 氧化損傷與 DNA 鹼基之切除修復

紫外線 游離輻射(ionizing radiation)與活性氧化物(reactive oxygen species, 簡稱 ROS)等被認為可能導致基因產生變異〔 Hailliwel *et al.*, 1989; Esterbauer *et al.*, 1990 〕。活性氧化物為具有高度氧化力的分子, 它會轉變成自由基; 人體中若存在過多的自由基, 細胞中的生物分子則會氧化, 因而造成細胞結構的損傷、加速細胞的老化。而細胞中 DNA 遭受到氧化損傷是無可避免的, 每個? 胞每天約有 10^4 個損害〔 Fraga *et al.*, 1990 〕。在這些不同的 DNA 鹼基氧化損傷中, 最穩定且最有害的為 7,8-dihydro-8-oxoguanine (簡稱為 8-oxoG 或 GO)〔 Shibutani *et al.*, 1991 〕。

核? 酸所包含的鹼基可分成四種: A (adenine, 腺嘌呤)、T (thymine, 胸腺嘧啶)、C (cytosine, 胞嘧啶)、G (guanine, 鳥嘌呤), 正確的鹼基配對為 A = T 與 C = G 配對。但 8-oxoG 可與鹼基 A 或 C 在 DNA 複製時透過聚合? 的作用結合形成鹼基配對, 而 8-oxoG/A 是錯誤的鹼基配對, 若不被修復將會造成原本 G/C 配對轉置成為 T/A 配對, 導致基因的永久突變, 而可能使基因的功能喪失〔 Shibutani *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 1992; Michanels *et al.*, 1992;

Moriya, 1993]。

DNA 修復是生物體維持正常生理現象的一個重要機制，為了維持基因體的穩定性，DNA 的修復是不可或缺的 [Friedberg *et al.*, 1995]。DNA 修復過程分為直接修復，重組修復和切除修復；其中切除修復又分成鹼基切除修復(Base Excision Repair，簡稱 BER)、核糖酸切除修復(Nucleotide Excision Repair，簡稱 NER)和錯配切除修復(Mismatch Repair，簡稱 MMR) [Eisen and Hanawalt, 1999]。

鹼基切除修復(BER)主要是針對 DNA 的小缺失作修補，由特定辨認 DNA 缺陷的專一性酵素-DNA 糖基解酶，移除錯配或受到氧化損傷的鹼基，而形成缺鹼基位置(apurinic/ apyrimidinic site，簡稱 AP site)；接著利用 AP 內切酶 (AP endonuclease)和磷酸雙酯酶 (phosphodiesterase)產生核糖酸的缺口(gap)，再由 DNA 聚合酶 (polymerase)填補缺口，最後再由 DNA 連接酶 (ligase)填補完好的 DNA [Wood *et al.*, 1990 ; Karp, 2002]。

相較於鹼基切除修復，核糖酸切除修復(NER)是在修復過程中，將包含損傷 DNA 大約 30 個核糖酸的片段切除，最後再補上正確的片段。在 DNA 損傷的部位會有特定蛋白質被吸引辨識錯誤的位置，並且其它輔助蛋白質會鍵結在損傷位置形成錯合物。接著利用內切酶在受損位置核糖酸的地方將其 5'端和 3'端切除，切下核糖酸片

段後，接著藉由 DNA 聚合酶與連接酶，將缺口的地方以正確的配對方式重新合成為原本的核糖核酸 [Wakasugi and Sancar, 1998; Araujo *et al.*, 1999]。

錯配切除修復(MMR)是修正在 DNA 複製時產生的錯誤，主要是將錯配的鹼基予以移除來避免突變的發生 [Kolodner and Marsischky, 1999]。例如，在大腸桿菌中參與修復 T-T dimer 主要酵素包括有 MutH、MutL 和 MutS。當 DNA 在細胞核中不進行複製及轉錄時，會被甲基酵素(methylase)甲基化，當 DNA 複製時，在新合成的一股 DNA 被甲基化之前，細胞內蛋白質有能力辨識新股與舊股的差異；而 MutS 會辨識因 DNA 複製錯誤會產生的歪曲雙螺旋結構(例如，T-T dimer)並與其鍵結，MutL 會接著鍵結上去穩定此錯合物，MutS-MutL 錯合物會活化 MutH，MutH 核酸內切酶會切開新複製的 DNA 股，接著重新合成和連結而達成修復 [Modrich, 1994]。

1-2 hMYH 在 DNA 氧化損傷修復機制中所扮演的角色

當人體細胞中 DNA 鹼基受到氧化傷害而產生 8-oxoG 時，8-oxoG 糖基水解酶 hOGG1、腺嘌呤糖基水解酶 hMYH 與 8-oxoGTP 糖基水解酶 hMTH1 這三種修復蛋白就會執行 DNA 氧化損傷修復的功能 [Krokan *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002]，修復機制如圖 1-1 所示。

其中 hMTH1 核糖三磷酸解可在核糖酸池(nucleotide pool)中水解氧化態的鳥糞嘌呤腺糖三磷酸 8-oxoGTP，使其降解為單磷酸的 8-oxoGMP，而單磷酸的核糖酸無法於複製過程中與模板 DNA 結合，因此就可避免因氧化的鹼基而造成的錯配發生 [Lu *et al.*, 2001; Colussi *et al.*, 2002]。

而 hOGG1 可將 8-oxoG/C 配對中的 8-oxoG 移除，或利用缺鹼基解糖 (AP lyase) 活性使 DNA 中的鹼基嘌呤開環，進而形成缺鹼基的位置，接著由聚合酶合成完整的 G/C 配對 [Shinmura *et al.*, 1997; Boiteux and Radicella, 2000; Vidal *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001]。倘若 8-oxoG/C 的累積超過 hOGG1 的修復，在進行 DNA 複製時，沒被修復的 8-oxoG 就會與 A 形成錯配，若沒有進行修復的話就可能產生由 G/C 變為 T/A 的永久性錯配。

此時需要 hMYH 腺嘌呤糖基解糖酶，它所扮演的角色是移除 8-oxoG/A 鹼基錯配中的腺嘌呤 A，接著合成修補正確的胞嘧啶 C，使之形成 8-oxoG/C 配對；接著 hOGG1 就可再次修復移除被氧化的鹼基 8-oxoG [Slupska *et al.*, 1996; Takao *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002; Fromme *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2005]。

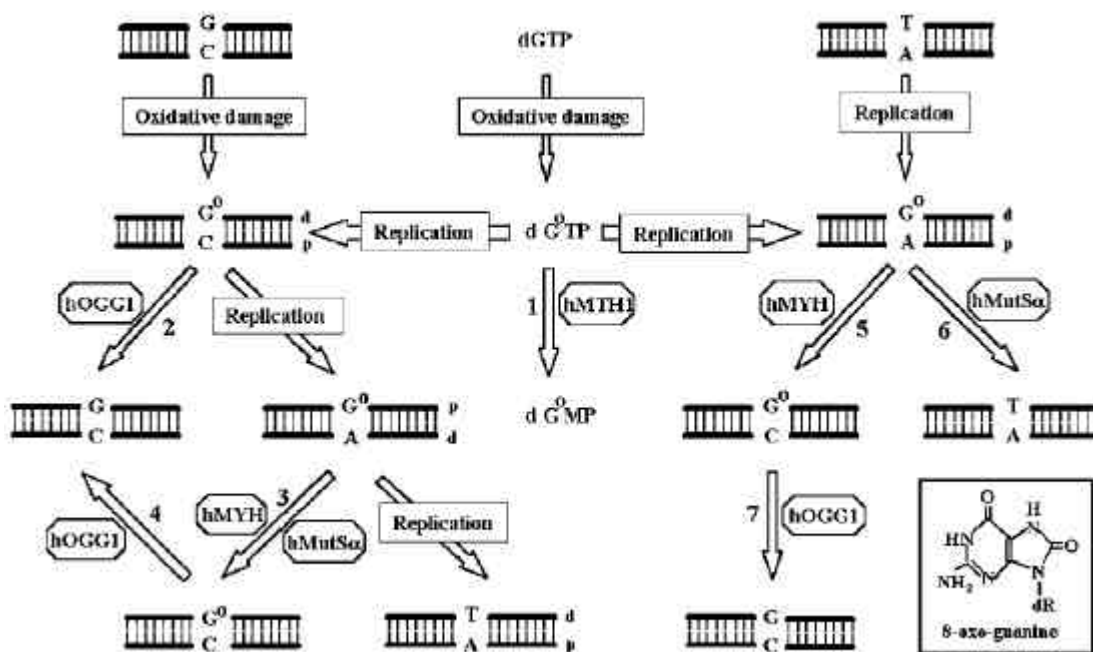


圖 1-1 人類細胞中 DNA 鹼基氧化損傷修復機制 [Gu *et al.*, 2002]

1-3 何謂單核？酸多態性

單核？酸多態性(single nucleotide polymorphism, 簡稱 SNP) 指的是特定物種的不同個體間，其基因體中 DNA 序列上發生單一核？酸 (A、T、C 或 G) 的變異。在人群中這種變異的發生頻率至少要大於 1%，也就是 100 人中至少有一例，才可被稱為 SNP。人類各種的遺傳變異約有 90% 是屬於 SNPs，是許多種變異中最常見的。SNP 雖是基因上微小的差異，卻導致了個體間顯著的差異。人與人之間的基因序列有約 99.9% 以上是一樣的，剩餘約 0.1% 的差異決定了每個個體的不同，也就是我們俗稱的「體質」。這些遺傳序列包含的訊息不僅決

定了他們在身高、膚色和體型等方面的差異，也決定了他們是否容易罹患某些疾病，以及對藥物會有何種反應等。當 SNP 發生在基因的編碼區域，則有可能導致蛋白質的失活，因此研究 SNP 可以尋找致病基因，甚至預測個人罹病的可能性，以及預測對疾病之抵抗力、藥物作用之安全性與有效性〔施鎧泓, 2004〕。

1-4 大腸直腸癌的介紹

大腸直腸癌(Colorectal Cancer)是世界上最普遍的惡性腫瘤之一，由世界衛生組織(World Health Organization, 簡稱 WHO)公佈資料指出，它為世界上癌症死亡原因的前四名。在種族差異上，白人較黑人有較高的機會得到大腸癌；在性別差異上，男性比女性罹患大腸癌的機會高。在台灣地區，由行政院衛生署統計資料顯示，民國九十五年十大死亡原因之首為惡性腫瘤，其中癌症死亡於大腸直腸癌，已經連續多年都維持在第三位，而且罹患大腸直腸癌的年齡逐年在降低，人數也有日益增加的趨勢。

大腸直腸癌的致癌原因有多種，包括遺傳因子、基因突變、致癌物質、飲食及生活習慣等交互作用造成的，並非只是由單一原因所引起。其致癌遺傳因子包括原癌基因(Oncogene)(如 *K-ras* 基因)的被活

化；或是腫瘤抑制基因(Tummor suppressor gene)(如 *APC* 基因及 *p53* 基因)失活；亦或調節基因(Modifier gene) (如 DNA 修復基因，*hMYH* 基因、*hOGG1* 基因和 *hMSH6* 基因)的功能喪失或突變〔郭志鎰, 2003; 李茂佑, 2005〕。

大部分的大腸直腸癌是偶發性的，但仍有約百分之十五有明顯的家族傾向，這顯示大腸直腸癌的發生與遺傳基因有密不可分的關係。目前臨床上可歸類出兩種明顯的遺傳性大腸直腸癌，即家族性結直腸瘻肉綜合症(family adenomatous polyposis of colon，簡稱 FAP)與遺傳性非息肉症性大腸癌(Hereditary nonpolyposis colorectal cncer，簡稱 HNPCC)。FAP 是一種顯性的遺傳疾病，此疾病的臨床表現為大腸內分布著數百到數千個腺瘤性息肉，而某些息肉最終會演變成癌症。HNPCC 是一種具有遺傳性傾向的癌症，此疾病特徵為在接近小腸附近的大腸會出現數目較少但體積較大的腫瘤性息肉〔郭志鎰, 2003; 李茂佑, 2005〕。

1-5 *hMYH* 單核？酸多態性與大腸直腸癌的相互關係

研究發現，人類 *hMYH* 雙等位基因突變(biallelic germline mutations，G : C→T : A)與大腸直腸癌和其它癌症的產生有密切的關

係 [Tajiri *et al.*, 1995]。先前已有研究顯示細胞中如果缺乏 hMYH 活性，基因突變的機率就會提高很多倍 [Wooden *et al.*, 2004]。圖 1-2 為在大腸直腸癌病例中，目前研究已證實在 hMYH 上的突變點，其中突變點 Y165C、G382D、V232F 和 R227W，分別位於 *hMYH* 不同區域(G382D：Adenine binding domain；Y165C：Pseudo-HhH motif；V232F/R227W：hMSH6 binding domain)，研究顯示這四個突變點的產生會影響 hMYH 修復蛋白的活性 [Enholm *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2004; Wooden *et al.*, 2004; Sampson *et al.*, 2005; Aceto *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2005]。這些突變熱點均與 hMYH 和 MutS 同源基因(hMSH2、hMSH6)的相互作用有關。hMSH2、hMSH6 亦為基因錯配修補蛋白，其中 hMSH6 可以提高 hMYH 的基因修復活性，共同避免 8-oxoG 損傷 [Gu *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2005]。表 1 為最常見的 *hMYH* 突變點處核？酸改變及其相應氨基酸改變的情形。

表 1 最常見的 *hMYH* 突變點處核？酸改變及其相應氨基酸改變的情形

突變點	核？酸改變	氨基酸改變
G382D	1145G→A	Gly→Asp
Y165C	494A→G	Tyr→Cys
V232F	694G→T	Val→Phe
R227W	697C→T	Arg→Trp

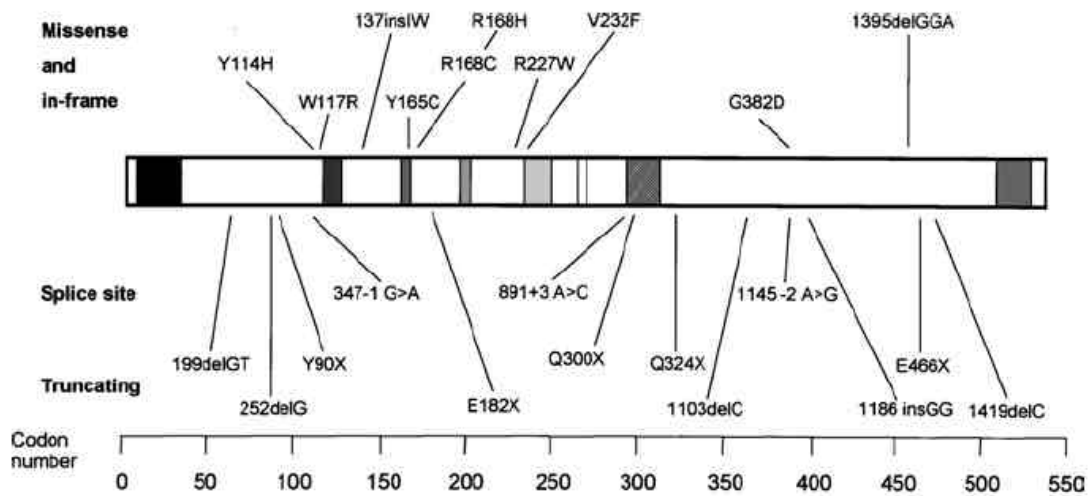


圖 1-2 在大腸直腸癌病例中，目前已被發現的 *hMYH* 突變點。其中 G382D、Y165C、V232F 及 R227W 最為常見 [Sampson *et al.*, 2005]。

1-6 Allele-Specific PCR 的介紹

聚合？連鎖反應(Polymerase Chain Reaction；簡稱 PCR)，為近代生物技術發展最被廣用的技術之一；它是個簡便且有效的方法，可以在短時間內獲得大量的特定 DNA 片段。目前 PCR 的技術已廣泛地應用在學術、工業、農業和醫學上的研究，例如 DNA 序列的直接分析、基因突變、基因選殖表現與及食品檢驗等。

快速、簡單、成本低、可靠度與靈敏度高等都是好的檢測 SNP 方法所必須的條件。一般測定 SNP 的常用策略是 Allele-Specific PCR(如圖 1-3，簡稱 AS-PCR)。其概念是只有在適當且嚴格的 PCR 反應條件(引子接合溫度、反應時間以及 DNA 模板濃度等下)，使用不具有

3'→5'的外切? 修復活性(proofreading exonuclease activity)的 Taq DNA 聚合? , 因此只有在 PCR 引子 3'端鹼基與 SNP 等位基因(allele) 正確配對時才有延伸反應並產生目標擴增產物[Bottema and Sommer, 1993] 。

本實驗室已有用 AS-PCR 方法來偵測老鼠 *H-ras* 基因編碼 61(codon 61)的特定突變點及估計馬兜鈴酸(Aristolochic acid)對中草藥腎病(Chinese Herb Nephropathy)和尿道上皮細胞腫瘤(urothelial tumor)所造成的風險 [Cheng et al., 2006] 。

但是在過去有發生基因型判別(genotyping)錯誤的例子, 其主要原因可能為所設計的引子對於檢測的對偶基因特異性(allele-specific)不高或可能因突變的比例低造成靈敏度低。引子 3'端鹼基與模板的鹼基錯配有多種不同組合, 而不同鹼基錯配其延伸程度也有所不同 [Mendelman *et al.*, 1990; Creighton *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1992; Ayyadevara *et al.*, 2000; Latorra *et al.*, 2003]。其中模板與引子設計鹼基的配對有兩種不被建議用在 AS-PCR 分析方法上, 如 G/G 與 A/A ; 相反地, T/G、 A/C、 C/A 及 G/T 這四種配對則是可行的 [Kwok *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1992; Ayyadevara *et al.*, 2000] 。

因此利用 AS-PCR 技術正確地檢測 SNP , 除了要有適當的 PCR 反應條件與反應試劑外, 引子的設計是一項相當重要的課題。因此陸

陸續有許多學者提出一些策略以提高 AS-PCR 的可靠度與靈敏度，例如在靠近引子 3'端額外增加引子與模板鹼基的錯配 [Newton *et al.*, 1989]；在引子的 3'端 OH 基團上加上不同的修飾，藉此增加錯配引子與模板的延伸阻力 [Bi and Stambrook, 1998; Latorra *et al.*, 2003] 等等。

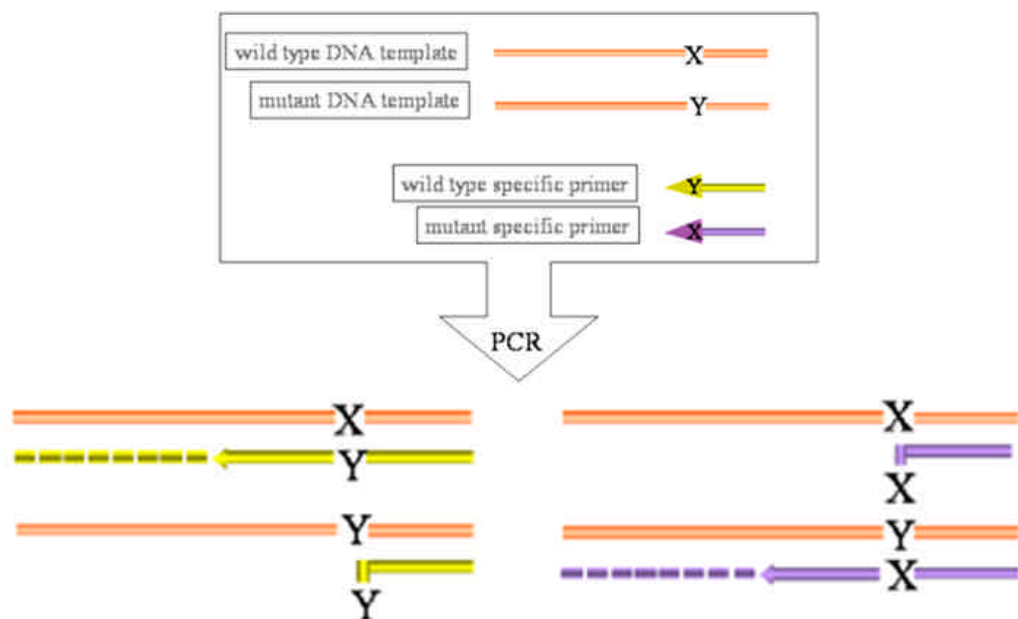


圖 1-3 Allele-Specific PCR 原理。X 與 Y 為 DNA 去氧核糖核酸之鹼基(A、T、C 和 G)，其中 X-Y 表示為正常配對(match)，X-X 與 Y-Y 為錯配(mismatch)。

1-7 研究動機

在台灣地區，由於飲食習慣西化、環境和化學物質污染、情緒污染和遺傳因素等因素，國人罹患大腸直腸癌的機率愈來愈高。研究發

現人類 *hMYH* 雙等位基因突變(biallelic germline mutations , G : C→T : A)與大腸直腸癌及其它癌症的產生有著密切的關係。因此本研究方向即與合作的醫院取得大腸直腸癌患者的組織之 genomic DNA, 針對已經被證實之的 *hMYH* 的幾個突變點進行實驗分析比較, 探討是否台灣病人在 *hMYH* 基因上的突變型態是否與其他國家相同, 釐清 *hMYH* 基因突變與台灣大腸直腸癌病例之關係。

本研究利用 AS-PCR 方法來篩選各個突變點。利用 AS-PCR 技術若要正確地檢測 SNP, 除了要有適當的 PCR 反應條件與反應試劑外, 引子的設計是一項相當重要的課題。因此提高 AS-PCR 的可信度與靈敏度, 並嘗試發展新的檢測分析方法, 建立未來早期診斷可行之方法, 也是本研究方向之一。