

中山醫學大學毒理學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Toxicology,
Chung Shan Medical University

指導教授：謝玲玲 博士 (Ling-Ling Hiseh, Dr. PH)

李 輝 博士 (Huei Lee, Ph. D.)

台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌基因體不穩定特徵
Characteristics of Genomic Instability in Taiwanese Oral
Squamous Cell Carcinoma

研究生：簡暉慈

學 號：9015001

中華民國九十二年七月

本論文為中山醫學大學授予學位之必備條件之一，經中山醫學大學醫學院毒理學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中研院生醫所副研究員

沈志陽

沈志陽

中山醫學大學毒理學研究所兼任教授

劉宗榮

劉宗榮

中山醫學大學助理教授

鄭雅文

鄭雅文

中山醫學大學毒理學研究所兼任教授

謝玲玲

(論文共同指導教授)

謝玲玲

中山醫學大學毒理學研究所教授

李輝

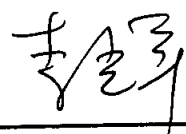
(論文指導教授)

李輝


中華民國九十二年六月

學生簡暉慈論文題目為「台灣地區口腔
鱗狀上皮細胞癌基因體不穩定特徵」，其論
文已經中山醫學大學醫學院毒理學研究所
碩士論文考試委員會審查合格及口試通
過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 李輝

簽名： 

謝玲玲

簽名： 

中華民國九十二年六月

謝 誌

從對實驗室完全陌生到完成碩士班學業已經快四年了，期間一直受到許多人的提攜與幫助，沒有你們就沒有今天的我，真的由衷感謝大家。首先要感謝指導老師 謝玲玲老師，是您領我進入研究領域，讓我有機會學習更多事物，感謝您在課業與實驗方面的細心指導，而您待人處世的認真與直率也是我學習的榜樣。另外要感謝李 輝老師為我打破許多所上的慣例，給予我絕對的包容與自由，希望今天的我已達到您當初的期望。感謝台北榮總教研部 劉宗榮老師，為我突破萬難，在實驗上給予完全的支持與幫助，沒有您的幫忙這本論文根本無法完成；謝謝口試委員劉宗榮老師、沈志陽老師以及鄭雅文老師在論文邏輯與結構上的斧正，讓我獲益良多，更明白在研究領域上需要抱持嚴謹、求真求實的态度。

另外，感謝實驗室的夥伴們，包括無敵萬能的妙珍學姊、在我怠惰時給予當頭棒喝的麗玲學姐、超級熱心的駭客國豪學長、每週三負責餵飽我們的吳啟銘組長以及文碧、志雄、盈穎、俊廷、田宏和黃祥富醫師，很慶幸在求學的路上能和各位夥伴們相識，謝謝你們讓實驗室天天充滿活力與歡笑。更要感謝台北榮總毒物研究室的育婷學姊，在我因實驗往來台北、林口期間，給予我莫大的幫助。

最後感謝我的家人以及最「麻吉」的好友正容和佳吟，謝謝你們的鼓勵，在我遭受挫折時幫助我建立自信，讓我能更勇敢的繼續向前邁進，謝謝你們！

目 錄

第一章 前言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 口腔癌的流行病學特徵	3
第二節 基因體不穩定與癌症研究的相關性	6
第三節 失去異合性	9
第四節 微衛星序列不穩定	19
第三章 研究目的	21
第四章 材料與方法	22
第一節 研究個案及檢體收集	22
第二節 血液檢體處理及 DNA 萃取	23
第三節 腫瘤組織 DNA 萃取	26
第四節 基因型檢測	28
第五節 資料分析	34
第五章 結果	36
第一節 台灣地區口腔癌腫瘤組織失去異合性的特徵	36
第二節 台灣地區口腔癌患者微衛星序列不穩定特徵	41
第六章 討論	43
參考文獻	75

表 目 錄

表 2-1 失去異合性相關研究	13
表 5-1 口腔癌組織總染色體臂 LOH 頻率分佈表	61
表 5-2 口腔癌組織微衛星序列標記 LOH 頻率 $\geq 40\%$ 之標記名稱 及其染色體所在位址	62
表 5-3 口腔癌組織染色體區段 LOH 頻率 $\geq 46\%$ 之微衛星序列標 記名稱	63
表 5-4 舌癌與頰膜癌失去異合性頻率均 $\geq 40\%$ 之微衛星序列標記 名稱及其染色體所在位址	64
表 5-5 微衛星序列標記失去異合性與腫瘤部位之特異性分析	65
表 5-6 特定微衛星序列標記群失去異合性與腫瘤部位之相關性 分析	66
表 5-7 微衛星序列標記失去異合性與腫瘤分期之特異性分析	67
表 5-8 特定微衛星序列標記群失去異合性與腫瘤分期之相關性 分析	68
表 5-9 微衛星序列標記失去異合性與酒精暴露之特異性分析	69
表 5-10 特定微衛星序列標記群失去異合性與酒精暴露之相關性 分析	70
表 5-11 口腔癌組織染色體 MSI 頻率分佈表	71

表 5-12 台灣地區口腔癌常見微衛星序列不穩定之標記名稱及其 染色體所在位址	72
表 5-13 微衛星序列不穩定與腫瘤部位之特異性分析	73
表 6-1 口腔癌及頭頸癌全基因體失異合性研究.....	44

圖 目 錄

圖 2-1 失去異合性的成因	10
圖 4-1 雷射捕捉顯微擷取的腫瘤細胞代表圖 (一)	53
圖 4-2 雷射捕捉顯微擷取腫瘤細胞代表圖 (二)	54
圖 4-3 失去異合性代表圖 (一)	55
圖 4-4 失去異合性代表圖 (二)	56
圖 4-5 微衛星序列不穩定代表圖 (一)	57
圖 4-6 微衛星序列不穩定代表圖 (二)	58
圖 5-1 口腔癌組織各染色體臂 LOH 頻率分佈圖	59
圖 5-2 口腔癌組織各染色體臂 MIN 頻率分佈圖	60

縮寫表

8-oxoguanine DNA glycosylase 1	OGG1
Adenomatous polyposis coli	APC
Aminoacylase	ACY
AP endonuclease	APE
Ataxia telangiectasia mutated protein	ATM
Atopic dermatitis 3	ATOD3
Base excision repair	BER
Breakpoint cluster region	BCR
Breast cancer 1	BRCA1
Chromosome instability	CIN
Chromosome long arm	q
Cyclin dependent kinase	CDK
Deleted in colon cancer	DCC
Double strand breaks	DSBs
Fractional allelic loss	FAL
Fragile histidine triad gene	FHIT
Hereditary non-polyposis colorectal cancer	HNPCC
Homologous recombination	HR
Laser capture microdissection	LCM
Leucine zipper putative tumor suppressor 1	LZTS1
Ligase 4	LIG4
Loss of heterozygosity	LOH
Mannose 6-phosphate/Insulin-like growth factor 2 receptor	M6P/IGF2R

Microsatellite instability	MSI or MIN
Microsatellite stable	MSS
Mismatch repair	MMR
Mitochondrial deoxynucleotide carrier	DNC
Mothers against decapentaplegic related protein	MADR
Murine double minutes gene	MDM
MutL homolog	MLH
MutS homolog	MSH
N-acylaminoacyl-peptide hydrolase	APEH
Neurofibromin 2	NF2
Non-homologous end-joining	NHEJ
Nucleotide excision repair	NER
Nucleotide instability	NIN
Optic atrophy 1 gene	OPA1
Oral squamous cell carcinoma	OSCC
P53 reductase 2	P53R2
Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten	PTEN
Polymerase chain reaction	PCR
Postmeiotic segregation	PMS
Protein or chromosome short arm	p
Replication error	RER
Restriction fragment length polymorphism	RFLP
Retinoblastoma	Rb
Squamous cell carcinoma of head and neck	SCCHN

Variable number of tandem repeat	VNTR
XAP binding protein 2	XAB2
Xeroderma pigmentosum complementation group A	XPA
X-ray repair complementing defective in chinese hamster	XRCC

摘要

口腔癌是台灣地區十大常見癌症之一，根據民國九十一年衛生署的統計資料中，口腔癌為男性十大癌症死因的第五位，死亡率為每十萬人 13.09 人，且死亡率逐年上升。台灣地區口腔癌的主要危險因子為抽菸、喝酒及嚼食檳榔，這些危險因子均會產生 DNA 傷害使基因體呈現不穩定的狀態。本研究以失去異合性與微衛星序列不穩定為指標，探討台灣地區男性口腔鱗狀上皮細胞癌的腫瘤基因體不穩定的特徵。

本研究以 30 位男性口腔鱗狀上皮細胞癌個案為對象，利用雷射捕捉顯微擷取技術取得高純度的腫瘤細胞，進行全基因體 382 個微衛星序列標記。初步發現台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌常見失去異合性的染色體臂（失去異合性頻率大於 26% 者）為 1q、2q、3p、4p、4q、5p、5q、6q、8p、8q、12p、14q、17p 及 19p。失去異合性頻率大於 40% 的微衛星序列標記有 26 個，分佈於 16 個染色體臂上，其中失去異合性頻率較高者依序為 D10S537 (62.5%)、D17S799 (61.5%)、D14S258 (60%)、D7S640 (58.3%)、D19S216 (57.1%)、D9S287 (54.6%)、D1S2868 (50%)、D1S2836 (50%)、D4S415 (50%)、D6S1581 (50%)、D20S178 (47.6%)、D2S142 (47.1%)、D19S210 (47.1%)、D8S260 (46.7%) 及 D13S173 (46.7%)。依微衛星序列

標記所在染色體位置，失去異合性較具一致性的區段有 48 個，其中失去異合性頻率 $\geq 46\%$ 的區段有 23 個，主要包含許多已知的抑癌基因及 DNA 修補基因之染色體區段，同時發現屬舌癌專一性的 LOH 微衛星序列標記有 D3S1311、D5S2027、D8S258、D12S368 及 D14S985；屬頰膜癌專一性的 LOH 微衛星序列標記有 D1S2878、D1S199、D5S424 及 D6S308。在微衛星序列不穩定部分，發現台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌微衛星序列不穩定 (MIN(+)) 頻率較高 (63.3% ,19/30)，同時在染色體臂 16q 之微衛星序列不穩定 (MSI) 頻率最高 (80%)。另外，舌癌在染色體臂 11q 有好發的 MSI 現象 (MSI 頻率為 78.6%)，同時發現屬舌癌專一性的 MSI 標記有 D5S424 及 D11S925，屬頰膜癌專一性的 MSI 標記有 D1S452、D3S1289、D6S422、D7S507、D9S171 及 D20S115。綜觀之，台灣地區男性口腔癌腫瘤基因體有高比率基因體不穩定的現象，同時腫瘤部位不同，基因體不穩定的微衛星序列標記也不同。

Abstract

Oral cancer is one of the ten leading causes of cancer death in Taiwan. According to Health and Vital Statistics Republic of China in 2002, oral cancer is the fifth leading cause of cancer death in man. The mortality rate of oral cancer was 13.09 per 100,000 and gradually increasing.

Epidemiological studies have indicated that the cigarette smoking, alcohol drinking and betel quid chewing are the major risk factors of oral cancer in Taiwan. In the present study, we use loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MIN) as the index to explore the features of genomic instability of male oral squamous cell carcinoma (OSCC).

With Laser Capture Microdissection (LCM) and 382 fluorescence labeled microsatellite markers, we have analyzed 30 male OSCC tumors for the loss of heterozygosity and microsatellite instability. The chromosome arms with high LOH frequency were 1q, 2q, 3p, 4p, 4q, 5p, 5q, 6q, 8p, 8q, 12p, 14q, 17p and 19p. Twenty-six markers on 16 chromosome arms showed high LOH frequency (>40%). The top 10 markers with high LOH frequency were D10S537 (62.5%), D17S799 (61.5%), D14S258 (60%), D7S640 (58.3%), D19S216 (57.1%), D9S287 (54.6%), D1S2868 (50%), D1S2836 (50%), D4S415 (50%) and D6S1581 (50%) in order. Twenty-three chromosome regions, mainly in the loci of tumor suppressor genes and DNA repair genes demonstrated high LOH frequency ($\geq 46\%$). Furthermore, there were 5 and 4 LOH specific markers for tongue (D3S1311, D5S2027, D8S258, D12S368 and D14S985) and buccal cancer (D1S2878, D1S199, D5S424, and D6S308), respectively. The frequency of MIN OSCC tumor was high in Taiwan (63.3%). Specific high frequency of microsatellite instability (78.6%) for tongue cancer was found on chromosome arm 11q. There were 2 and 6 microsatellite

instability specific markers for tongue (D5S424 and D11S925) and buccal cancer (D1S452, D3S1289, D6S422, D7S507, D9S171 and D20S115), respectively. Taken together, high frequency of genomic instability was observed in Taiwanese male OSCC tumors and distinct markers for tongue and buccal cancer were found respectively.

第一章 前言

根據行政院衛生署統計資料，自民國七十一年起，惡性腫瘤即高居國人十大死因第一位，且罹癌人口有逐年上升的趨勢，癌症儼然為國人最大的健康威脅。其中口腔癌的發生率也於民國八十五年大幅躍升為男性十大常見癌症的第五位，超越鼻咽癌成為頭頸部癌症的頭號殺手；根據民國八十八年癌症登記資料，口腔癌的發生率與死亡率分居於第八位及第七位。若以八十九年（死亡率 6.73/十萬人）與八十八年（死亡率 5.90/十萬人）的癌症死亡率做比較，口腔癌是死亡率增加最快的常見癌症，上升比率為 14.2%。口腔癌常見於開發中國家 (Gupta et al., 1982)，台灣雖擠身已開發國家之林，口腔癌的發生率卻屢升不降，這是值得國人關注的問題。歐美國家的研究結果發現口腔癌的發生與抽菸、嚼食菸草及飲酒有密切的相關性。在印度、東南亞地區（包括台灣）及南非等有嚼食檳榔習慣的國家，研究者發現檳榔嚼食與口腔癌的發生有密切關聯。台灣地區口腔癌患者大多有嚼食檳榔的習慣，口腔癌的常見部位也集中於舌及頰膜兩處，主要為鱗狀上皮細胞癌 (Muir et al., 1995)。正常細胞的癌化必須經過多重步驟的傷害累積造成，如：原致癌基因 (proto-oncogenes) 經由點突變 (point mutation)、基因增幅 (amplification)、基因重組 (rearrangement) 等改變而活化；或是抑癌基因 (tumor suppressor gene) 因缺失

(deletion)、有絲分裂的基因重組 (mitotic recombination)、染色體不分離 (nondisjunction) 而失活(Lasko et al., 1991; Weinberg, 1989), 種種的基因變異 (gene alteration) 造成癌細胞處於基因體不穩定 (genomic instability) 的狀態。本論文嘗試由基因體的角度, 利用染色體失去異合性 (loss of heterozygosity, LOH) 及微衛星序列不穩定 (microsatellite instability, MIN) 分析來探討口腔癌 (舌及頰膜鱗狀上皮細胞癌) 基因體不穩定性的特徵, 進一步分析其與抽菸、飲酒、嚼檳榔等危險因子的相關性。

第二章 文獻探討

第一節 口腔癌的流行病學特徵

頭頸部腫瘤 (Head and neck cancer) (其中包括口腔癌) 是全球常見癌症的第六位(Parkin et al., 1993), 根據國際疾病分類 (ICD-9 code), ICD-9 140-149 皆列為口腔癌, 但我國的口腔癌定義 (行政院衛生署) 並不包括主唾腺惡性腫瘤 (T-142) 及鼻咽惡性腫瘤 (T-147), 僅含唇 (T-140)、舌 (T-141)、齒齦 (T-143)、口底 (T-144)、口腔之其他未詳細說明部位 (T-145)、頰黏膜 (T-145.0)、齶 (T-145.2 T-145.3 T-145.5)、白後區 (T-145.6)、頰黏膜、齶及白後區除外之口腔其他未詳細說明部位 (T-145.1 T-145.4 T-145.8 T-145.9)、口咽 (T-146)、下咽 (T-148)、咽和唇、口腔及咽之分界不明部位 (T-149) 作為口腔癌主要的分區。口腔癌之組織病理分類可區分為鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma)、腺囊樣癌 (adenocystic carcinoma)、疣狀癌 (verrucous carcinoma)、黏液上皮樣癌 (mucoepidermoid carcinoma) 等, 除唾液腺及齒齦外之口腔內腫瘤有百分之九十五以上是屬於鱗狀上皮細胞癌(Muir & Weiland, 1995)。

歸納歐美已開發國家之頭頸部腫瘤研究結果, 酒精和菸草是頭頸部腫瘤 (包括口腔癌) 較確定的危險因子 (Maier et al., 1992; Vokes et al., 1993)。以無喝酒的吸菸族群進行的研究, 發現吸菸會增加罹患頭頸

部腫瘤的相對危險性達 20 倍之多。另外，在一些特殊部位的頭頸部腫瘤，如口腔、咽、喉，酒精攝取及香菸暴露具有加成作用，會使罹癌的相對危險增加 2 ~ 140 倍(Maier et al., 1992)。根據國際癌症研究中心 (IARC) 口腔癌的統計資料：就男性而言，除印度 Bombay 地區外，口腔癌好發在抽菸或嚼食菸草及飲酒比例高的國家或地區，如法國及加拿大(Parkin et al., 1997)。在女性方面，口腔癌發生率最高的地區是印度及東南亞地區，其中值得注意的是印度及東南亞地區的居民有嚼食檳榔的習慣，同時這些地區女性的檳榔嚼食率甚至高於男性，這點也反映出嚼食檳榔與口腔癌的關聯性。因此國際癌症研究中心 (IARC) 做出嚼食含菸草的檳榔嚼塊與口腔癌具有相關性的結論 (IARC, 1986)。另外，若以口腔癌好發部位觀之：可以發現在歐美國家主要好發部位為舌 (tongue, ICD-9 141) 及口底部 (floor of mouth, ICD-9 144)；而在印度及東南亞地區，口腔癌好發部位偏向頰黏膜 (buccal mucosa, ICD-9 145.0) 及舌。好發部位的差異性暗示可能致癌的危險因子有所不同，後者可能因為嚼食檳榔而使頰黏膜部位的腫瘤比率提高。

台灣地區男性口腔癌標準化發生率在男性主要癌症中排名第四位。在有嚼食檳榔習慣的國家中，台灣地區男性口腔癌發生率僅次於印度。根據衛生署民國九十年的統計資料，台灣地區男性口腔癌死亡

率為每十萬人 12.6 人，居男性主要癌症死因之第 5 位，其死亡率為男性各主要癌症死因中竄升最快者，與民國 80 年相較，其死亡率增幅達 1.7 倍。男性口腔癌死亡之年齡中位數為 53 歲，女性為 68.5 歲，同時衛生署調查發現台灣地區口腔癌患者八成以上有嚼食檳榔的習慣。男性口腔癌死亡年齡偏低，且各年齡組之男性死亡率均明顯高於女性，此現象應與嚼檳榔者以男性居多有關。在台灣地區的檳榔嚼塊並不加菸草，嚼食型態與新幾內亞地區相似(Thomas et al., 1994)，但與印度含菸草之檳榔嚼塊不同。不過在台灣地區嚼食檳榔的族群中常見同時有抽菸或飲酒的習慣，1995 年葛應欽等人的病例對照研究發現，同時有吸菸、飲酒及嚼食檳榔者，其罹患口腔癌的風險是不吸菸、無飲酒且不嚼食檳榔者的 123 倍(Ko et al., 1995)。因此台灣地區口腔癌的主要危險因子為吸菸、飲酒及嚼食檳榔。

第二節 基因體不穩定與癌症的相關性研究

一、基因變異 (Genetic alteration)

癌症的成因十分複雜，一般認為細胞累積內因性或外因性的基因傷害，直接或間接造成細胞生長與死亡的失控，進而使細胞產生癌變 (Lengauer et al., 1998)。通常這些基因傷害可藉由 DNA 修補系統加以修復，但當細胞內某些修補系統失去功能或基因損傷的訊息傳遞產生錯誤，基因體將產生種種變異 (alteration)。一般而言基因變異可區分為四大類 (Lengauer et al., 1998)：

(一) 小片段的 DNA 序列改變 (Subtle sequence changes)

即 DNA 序列中少數幾個核苷酸的取代 (substitution)、缺失 (deletion)、或插入 (insertion)。例如在超過 80% 的胰臟癌中可發現 K-ras 基因的錯義突變 (missense mutation) (Almoguera et al., 1988)，另外在頭頸部腫瘤中可發現 p53 基因的變異，包括約 31% G-A 的轉變 (transition) 突變、18% G-T 的轉換 (transversion) 突變以及 19% 的缺失或插入 (Ibrahim et al., 1999)。其形成機制可歸因為兩類：(1) DNA 聚合反應時聚合酵素的校讀 (proofreading) 功能失常；(2) DNA 損傷的修補功能失常。

(二) 基因增幅 (Gene amplifications)

即染色體上的某一區段產生增幅 (amplification) 現象。目前研

究發現在癌症形成後期，致癌基因常有增幅的現象，如乳癌（breast cancer）組織中常發現有 HER2/neu 基因增幅(Pegram et al., 1998)；約 30% 的晚期神經細胞瘤（advanced neuroblastomas）中發現 N-myc 有增幅的現象(Seeger et al., 1985)。

（三）染色體數目改變（Alteration in chromosome number）

即丟失或增加整條染色體，或染色體中的某個區段發生改變，如異倍體（aneuploidy）。例如在神經膠原母細胞瘤（glioblastoma）中發現第十號染色體的丟失，因而失去抑癌基因 *PTEN*(Wang et al., 1997)；在乳突型腎癌（papillary renal carcinoma）中發現第七號染色體增加，使致癌基因 *MET* 加倍（duplication）(Zhuang et al., 1998)。

（四）染色體易位（Chromosome translocations）

即不同染色體上的基因區段產生易位或相同染色體上的非連續區段排列改變。例如在慢性髓鞘性白血病（chronic myelogenous leukaemia, CML）中發現位於第九號染色體上的 *c-abl* 基因產生易位，因而與第二十二號染色體上的 *BCR* 基因形成結合基因產物 (Nowell, 1997)。另外常見於實體腫瘤（solid tumor）的染色體易位則是以基因失去異合性（loss of heterozygosity, LOH）的特徵呈現，如在肺癌組織中可發現 1p、3p、4p、4q、5q、8p、9p、10p、10q、13q 發生 LOH，可能影響位於這些染色體區段上的抑癌基因表現(Girard et

al., 2000)。

二、基因體不穩定 (Genomic instability)

基因變異並不代表基因體不穩定，所謂基因體不穩定是以基因變異的頻率來定義。在正常細胞中基因變異十分罕見，基因體會維持在一種穩定 (stable) 的狀態。通常基因變異發生後，細胞會利用一連串的修補機制進行修補 (repair)，若基因變異過於嚴重則細胞會走向死亡 (apoptosis or programmer cell death)。因此細胞得以藉由這些機制維持基因體的穩定。但在腫瘤細胞中，基因變異會因異常的細胞環境而被選擇性保留，經同源增生 (clonal expansion) 致使大多數的細胞出現基因變異而掩蓋原本正常細胞的表現，這種現象稱為基因體不穩定 (genomic instability) (Schar, 2001)。基因體不穩定可區分為三個層次，即 (a) 核苷酸不穩定 (nucleotide instability, NIN) (b) 微衛星不穩定 (microsatellite instability, MIN) (c) 染色體不穩定 (chromosomal instability, CIN) 涵蓋上述的基因變異。其中染色體不穩定涵蓋範圍較廣，凡屬染色體層次的改變皆屬此類，如染色體數目改變、染色體中區段的易位、增幅、缺失等都屬於這個層次。

第三節 失去異合性 (Loss of Heterozygosity, LOH)

一、失去異合性

健康的個體中，體細胞 (somatic cell) 皆含有兩個對偶基因 (allele)，分別來自母系及父系的染色體。所謂的失去異合性是源自於對抑癌基因的定義，一個功能正常的抑癌基因擁有一對對偶基因，當其中一個對偶基因發生突變或出現異常功能的變異後，這對基因為異型合子 (heterozygous) (一對偶基因具正常功能，而另一對偶基因失去功能)，當保有正常功能的對偶基因也失去時，即稱為失去異合性。失去異合性的結果會使原本仍具有功能性的基因完全喪失正常的功能。1971 年 Knudson 提出「雙重打擊假說」(Two-Hit Hypothesis) (Knudson, 1971)，認為引起視網膜母細胞瘤 (retinoblastoma) 機制是由於患者的 Rb 基因在遺傳過程當中經由親代獲得一個突變的對偶基因，另一個正常的對偶基因在視網膜母細胞分裂時發生變異，結果造成 Rb 基因完全失去功能，以至於患者在幼年就會有罹患視網膜母細胞瘤。1983 年 Cavenee 等的研究顯示 Knudson 所提出的雙重打擊假說中的第二次打擊應是來自於染色體的變異例如缺失 (deletion)、有絲分裂的基因互換 (mitotic recombination) 或是染色體不分離 (nondisjunction) 所造成的染色體缺失，透過這些機制可能造成 Rb 基因失去異合性 (Cavenee et al., 1983)。1988 年 Dunn 等的研究證實了

這個模式(Dunn et al., 1988)。因此 Rb 基因成為第一個以此假說確認的抑癌基因。由於絕大多數的抑癌基因都依據此模式失去功能，只不過在偶發性癌症 (sporadic cancer) 抑癌基因失去功能的過程中，兩個對偶基因的改變都是發生在體細胞層次，也因此失去異合性的分析廣被應用於搜尋各種癌症可能的抑癌基因。

二、失去異合性的成因

如圖 2-1 所示，失去異合性的成因有：(1) 基因片段缺失 (deletion) (2) 有絲分裂基因重組 (mitotic recombination) (3) 染色體不分離 (mitotic non-disjunction) (4) 基因轉變 (gene conversion) (5) 染色體缺失 (chromosome loss) 或單套染色體複製 (duplication) (Lasko et al., 1991)。

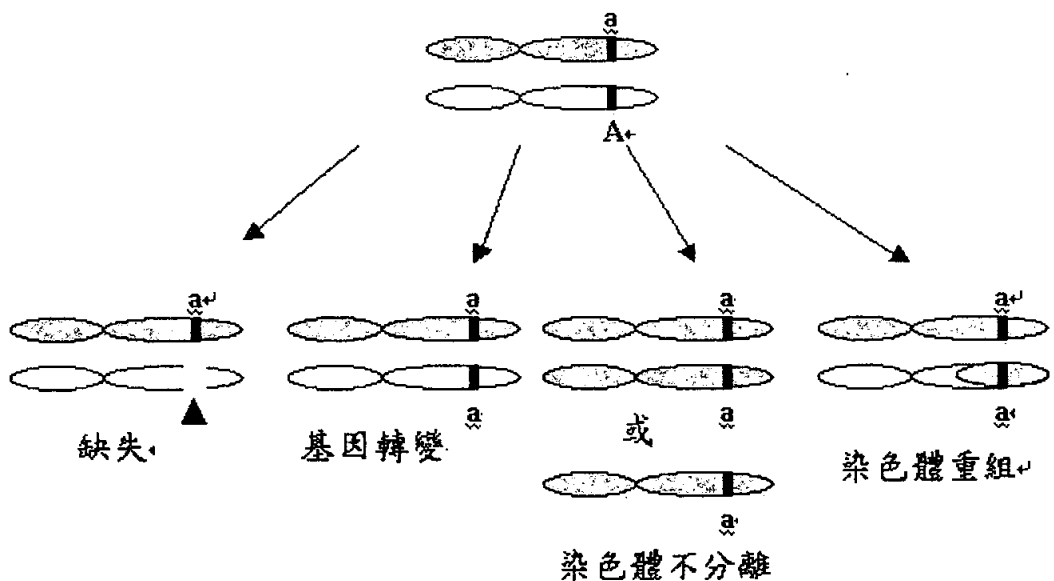


圖 2-1 失去異合性的成因

失去異合性的機制有多種可能，其中體細胞基因重組 (somatic recombination) 所造成的失去異合性佔約 75% (Lasko et al., 1991)。

Benjamin 及 Godwin 等 (Benjamin et al., 1991; Godwin et al., 1994) 以哺乳類動物細胞株所作的研究，發現自發性 (spontaneous) 發生對偶基因重組的機率非常低，因此推測失去異合性的主要因素是 DNA 在雙股斷裂 (double strand breaks, DSBs) 後的修補機制所造成的結果；當然也可能是因控制細胞生長的基因受到上述過程的影響而失去功能，進而促使細胞增生，增加基因重組的機率。DNA 雙股斷裂的原因有游離輻射 (ionization radiation) 傷害、其他 DNA 損傷化學物質的影響；一般在正常 DNA 代謝過程中也可能發生 DNA 雙股斷裂。

DNA 雙股斷裂的修補機制有兩種：一為同源重組 (homologous recombination, HR)，另一為非同源終端結合 (non-homologous end-joining, NHEJ)。此兩種修補機制相互配合負責細胞內 DNA 雙股斷裂的修復工作。

三、失去異合性與癌症的相關性研究

染色體組型 (karyotype)、限制酵素片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、DNA 變異性重複序列 (variable number of tandem repeat, VNTR)、微衛星序列 (microsatellite sequence)

分析等方法可以偵測失去異合性。其中微衛星序列分析是目前被廣泛應用的分析法。微衛星序列是廣佈於基因體的特殊重複性序列。常出現的形式有 mono-nucleotide、di-nucleotide、tri-nucleotide 或 tetra-nucleotide 的重複性序列。通常微衛星序列並不會轉譯出蛋白 (Endow et al., 1975)，但由於它的廣佈性及特殊性，所以廣被應用於親子鑑定及遺傳性疾病及癌症失去異合性研究。

近年來以微衛星序列分析各種癌症（口腔癌除外）失去異合性的研究整理於表 2-1：

表 2-1 失去異合性相關研究

作者 年代	癌症類型	標記數	結果摘要
Simoneau et al. (1996) 美國 (Simoneau et al., 1996)	膀胱癌 (n=69)	8	(1) 第 9 號染色體長臂 (q arm) 缺失可能是膀胱癌早期即出現的基因傷害。 (2) 第 9 號染色體短臂的近端及長臂的遠端是可能存在著抑癌基因。
Sheu et al. (1999) 台灣 (Sheu et al., 1999)	肝癌 (n=34)	231	(1) 常見失去異合性染色體區段：16q (47.1%) 13q (32.4%) 17p (32.4%) 5q (26.5%) 及 9p (20.6%)。 (2) 體內有 B 型肝炎病毒帶原者易在染色體 5q11p 及 16q 發生失去異合性。 (3) D16S409(16q21.1) 是最常發生失去異合性的標記。
Shao et al. (2000) 中國大陸 (Shao et al., 2000)	鼻咽癌 (n=98)	382	(1) 針對 98 位鼻咽癌患者檢體做 22 對體染色體進行全基因體失去異合性掃描，發現在 83 個位置出現高比率的失去異合性現象，其中以第 3、5、9、11 號染色體出現比率最高 (≥50%)。 (2) 6p23、8p23.1 及 9q34.2 失去異合性的現象在癌症晚期 (TNM III 及 IV) 較常出現。
Sengelov et al. (2000) 丹麥 (Sengelov et al., 2000)	尿道癌 (n=56)	6	針對染色體 1p、8p、10p、13q 及 17p 進行分析，發現 17p 失去異合性比率最高 (50%)。

表 2-1 失去異合性相關研究 (續)

作者 年代	癌症類型	標記數	結果摘要
Shen et al. (2000) 台灣 (Shen et al., 2000)	乳癌 (n=100)	400	<p>(1) 17p12 (48.4%)、16q22.1 (42.0%)、17p13.3 (41.6%)、17p13.2 (37.7%)、11q22.1 (34.4%) 及 1q32.1 (33.9%) 失去異合性比率較高。</p> <p>(2) 在失去異合性比率較高的區段可發現與 DNA 雙股斷裂相關的基因，如 p53、ATM。</p> <p>(3) DNA 雙股斷裂相關基因在腫瘤晚期與分化較差的腫瘤組織失去異合性比率較高，且具統計上的差異。</p>
Wistuba et al. (2001) 智利 (Wistuba et al., 2001)	膽囊癌 (n=24)	182	<p>針對 22 對體染色體及 X 性染色體進行分析，發現在染色體 3p、6q、7q、8p、9p、9q、11q、12q、17q、18q、19p、22q 及 Xq 中失去異合性的比率高於 60%。</p>
Simpson et al. (2003) 英國 (Simpson et al., 2003)	腦下垂體腺瘤(包括無內分泌活性腺瘤) (n=100) 並區分為侵襲性及非侵襲性	122	<p>(1) 發現侵襲性腦下垂體腺瘤失去異合性比率最高。</p> <p>(2) 在腦下垂體腺瘤發現染色體 1q、2p、9p、11p、11q、13p、14q、16p、17p 及 18p 的失去異合性比率在侵襲性組較高；而無內分泌活性腺瘤則是出現在染色體 1q、3q、9q、12p。</p>

四、口腔癌失去異合性文獻綜覽

有關口腔癌及頭頸部鱗狀上皮細胞癌 (Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck, SCCHN) 失去異合性的研究非常多，分析標記位置與數量不同，結果也有些許差異。有關 SCCHN 及口腔癌失去異合性的研究結果依各染色體別歸納如下：

在口腔癌組織中常可發現位在三號染色體上基因的變異，特別是位於第三號染色體短臂上(3p)的基因(Maestro et al., 1993; Partridge et al., 1994)。若以染色體區段而言，最常發生缺失的區段為 3p13-p21.1、3p21.3-23 及 3p25，發生率可達 52% (Uzawa et al., 1998)。目前已知在第三號染色體短臂上至少存在 3 個以上的抑癌基因，如在最常發生缺失的 3p21 區段上有 D8 (CHCM, ubiquitin-activating enzyme) 基因、ACY1(aminoacylase)基因、APEH 基因及與 DNA 修補相關的 hMLH1 基因(Scully et al., 2000b)。另外在 3p14 的脆裂點 (fragile site)，區段上有一 FHIT 基因 (3p14.2)，其轉譯出的蛋白質具有雙核苷三磷酸水解酵素 (dinucleoside triphosphate hydrolase) 活性(Virgilio et al., 1996)。

Pershhouse 等發現約 75% 的 SCCHN 腫瘤組織在第四號染色體長臂 (4q) 4q25 區段出現缺失的情形，因此在此區段也被認為可能含有一重要的抑癌基因(Pershhouse et al., 1997)。

約 25-73% 的口腔癌患者可發現五號染色體的基因改變，而較常

見的 LOH 區域出現在五號染色體長臂 (5q) 上，在 5q21-22 區域存在一 APC (adenomatous polyposis coli) 基因 (Huang et al., 1997; Mao et al., 1998)。

約有 21-38% 的口腔癌組織在 6p 發現失去異合性，另外也有 23-25% 的口腔癌組織在 6q 失去異合性 (Califano et al., 1996; Nawroz et al., 1994)。已知 p21 抑癌基因位在 6p21 區段，在口腔癌組織中常偵測到不正常的 p21 蛋白表現 (Erber et al., 1997)。

Voravud 等在口腔癌及其鄰近的正常組織甚至是口腔癌前期 (pre-malignant) 的細胞中發現到第七號染色體 7p 或 7q 失去異合性 (Voravud et al., 1993)。在 7q 上有一抑癌基因 PP5/TFPI-2，其蛋白產物具有抑制蛋白水解酵素的活性，可抑制多種癌細胞分泌的纖維蛋白酵素 (thrombin)、胞漿素 (plasmin) 及胰蛋白酶 (trypsin) (Wang et al., 1998)。

約 40% 的 SCCHN 及口腔癌組織在第八號染色體的短臂 (8p) 有缺失及失去異合性的情形 (Califano et al., 1996)，特別是 8p11-p21、8p22 及 8p23 染色體區段，因此此區段可能有 2 個以上的抑癌基因存在 (Wu et al., 1997)。

SCCHN 或口腔癌組織最常發現在第九號染色體短臂有失去異合

性的情形。在 9p 至少有 5 個常發生失去異合性的位置，居所有染色體之冠。口腔癌組織有高達 72% 的失去異合性比率在 9p21-p22 區段 (Califano et al., 1996; Van der Riet et al., 1994)，另外，在浸潤前期 (pre-invasive) 的癌細胞在此區段也有 LOH 的現象。已知 p16 抑癌基因位於 9p21-p22 區段，p16 基因是 CDK 抑制者，參與調控細胞週期的進行。p16 基因所轉譯的另一蛋白—P19 也同樣具有調控細胞週期的功能。p19 蛋白可與 MDM2 蛋白結合，使 p53 蛋白得以調控下游基因的轉錄。所以失去 p16 基因的正常功能，無疑是使細胞週期失控而促進細胞增生的步驟 (Scully et al., 2000a)。除 LOH 或是缺失以外，在 p16 基因的啟動子 (promoter) 處高度甲基化也會導致 p16 蛋白不表現。約 30% 的 SCCHN 及口腔癌組織 p16 基因啟動子有高度甲基化的現象 (Gonzalez et al., 1997)。口腔癌在 9q 出現 LOH 的情形較罕見，但是有 35% 的 SCCHN 在 9q31-34、9q22.1-q32 發生 LOH (Ah-See et al., 1994)。因此該區段可能也有抑癌基因存在。

PTEN 基因為一可能的抑癌基因，位在 10q23 區段。約 10% 的 SCCHN 在此區段發生 LOH (Chen et al., 2000)。

口腔癌組織第十一號染色體發生 LOH 比率約為 50% (Califano et al., 1996)。在 11q23 和 11q25 區段可能存有抑癌基因，且與口腔癌的形成有一定程度的相關性。

約 50% 的 SCCHN 在 13q 有 LOH 的現象(Califano et al., 1996; Yoo et al., 1994)。LOH 出現的區段大都鄰近 Rb 基因，雖然過去的研究發現 Rb 基因缺失在口腔癌發展中並非一重要角色(Yoo et al., 1994)，但最近 Pande 等對於在菸草及檳榔嚼食相關的口腔癌及口腔癌前期發現 Rb 基因具有其重要性(Pande et al., 1998)。

已知 p53 抑癌基因位在 17p 上，27-60% 的口腔癌組織有 p53 基因突變的情形。17p LOH 的頻率在 SCCHN 約為 50% (Adamson et al., 1994)，涵蓋 TP53 的比率約為 40%。同時 p53 基因的變異應是發生在癌化過程中的早期(Regezi et al., 1995)。

約 49% 的 SCCHN 組織在 18q 發生失去異合性(Cowan et al., 1992)。而 LOH 最常發生的區段是 18q21.1-23(Jones et al., 1997)。雖然 DCC (deleted in colon cancer) 抑癌基因位於 18q21.1，但在 SCCHN，LOH 所發生的區段並不包括此基因。因此可能是其他的抑癌基因發生缺失，目前推測可能是 18q21 上的 MADR2 基因(Rowley et al., 1995)。

約 44% 口腔癌組織在 21q 發生 LOH，LOH 的位置主要在 21q11.1 及 21q21，推論可能有三個抑癌基因位於 21q 上(Califano et al., 1996)。

約 73% 口腔癌組織在 22q13 區段發生 LOH，但並非 NF2 基因發生缺失(Miyakawa et al., 1998)。

第四節 微衛星序列不穩定 (Microsatellite instability, MSI)

微衛星序列不穩定現象最早是在偶發性大腸直腸癌 (sporadic colorectal carcinoma, CRC) 的腫瘤基因體中發現(Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993)。這種基因變異被認為是在 DNA 複製時因 DNA 聚合酵素滑動 (slippage) 所造成，所以又被稱為複製錯誤 (Replication Error, RER)。雖然改變微衛星序列的重複次數並不一定會改變其表現型 (phenotype)，但具有這種特性的細胞容易因累積複製錯誤而走向癌化。

MSI 形成的另一因素是 DNA 錯配修補機制 (Mismatch Repair, MMR) 失常。Aaltonen 等發現 MSI 較常出現在家族非息肉性大腸直腸癌 (Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) 的腫瘤基因體中(Aaltonen et al., 1993)。HNPCC 個案發病年齡較早且有家族聚集現象。Ionov 及 Lindblom 等進一步發現 HNPCC 腫瘤基因體 MSI 產生原因是 DNA 修補系統中錯配修補 (mismatch repair, MMR) 基因發生變異致失去正常功能所造成(Ionov et al., 1993; Lindblom et al., 1993)。HNPCC 個案遺傳所得之突變基因與偶發性大腸直腸癌個案體細胞突變 (somatic mutation) 的基因相同，因此有相同的表現型。且在 MMR 修補系統中，目前已知與 MSI 有關的基因有六個，包括：MSH2 (2p21)、MSH3 (5q11-13)、MSH6 (2p21)、PMS2 (7p22)、

MLH1 (3p21-23) 及 PMS1 (2q31-33)。除大腸直腸癌外，許多癌症的腫瘤基因體也有微衛星不穩定的現象，例如 Yee 等發現約 20% 的乳癌 (breast cancer) 患者有 MSI 的情形(Yee et al., 1994)。Lin 等報告約 41% 的胃癌有為衛星不穩定的情形(Lin et al., 1995)。在非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer) 有 21-68%的腫瘤呈現微衛星不穩定的情形(Adachi et al., 1995; Rosell et al., 1997)。

口腔癌及頭頸癌腫瘤組織也有微衛星不穩定現象。Ishwad 等檢測 91 對口腔癌檢體，其中 7% 有 MSI 的現象，且涵蓋 50-74% 的微衛星標記(Ishwad et al., 1995)，Miyakawa 等以第二十二號染色體上的基因標記偵測 33 個樣本，發現 MSI 的發生頻率為 42.4% (Miyakawa et al., 1998)。Mahale 等針對印度地區與長期嚼食菸草有關的 77 個口腔癌檢體進行第九號染色體微衛星序列不穩定分析，發現 27% 的檢體在 9p 或 9q 呈現 MSI，最常見的位置在 9p21-23，即 p16 基因所在位置(Mahale et al., 2000)。綜合言之，口腔癌檢體出現 MSI 的頻率為 3-40%，較常發生 MSI 的基因主要分佈於 3p、6p、7q、9p、11p、11q。

第三章 研究目的

流行病學研究顯示台灣地區口腔癌發生率不斷攀升，死亡率也逐年增加。台灣地區口腔癌的主要危險因子為嚼食檳榔、抽菸與喝酒。基因體不穩定是腫瘤基因體一個重要的特徵，本研究中試圖利用 382 個微衛星標記進行口腔癌「全基因體」失去異合性及微衛星序列不穩定分析，以歸納台灣地區口腔癌基因體不穩定的特徵，作為未來深入探討基因體不穩定與口腔癌危險因子暴露及腫瘤部位相關性研究的基礎。

第四章 材料與方法

第一節 研究個案及檢體收集

本研究之 30 位男性口腔癌個案來自林口長庚醫院，分別收集手術前靜脈血及手術切除之腫瘤。同時收集病患基本資料及腫瘤登錄資料，包括血型、教育、職業、生活習慣（抽菸、喝酒、嚼檳榔）及各類食物攝取頻率以及腫瘤分期等臨床資料。研究對象之平均年齡為 46.5 歲，期病理組織均為口腔鱗狀上皮細胞癌（oral squamous cell carcinoma），腫瘤部位為頰黏膜（buccal mucosa）（n=16）及舌（tongue）（n=14）兩種。腫瘤分期為，第一期者有 3 例（10%）、第二期者有 10 例（33.33%）、第三期者有 3 例（10%）、第四期者有 14 例（46.67%）。28 位有吸菸史（93.33%）、29 位有嚼檳榔史（96.67%）、20 位有喝酒史（66.67%）。

第二節 血液檢體處理及 DNA 萃取

(一) 溶液製備：

紅血球溶解緩衝溶液 (RBC lysis buffer, pH 7.6)：

0.32 M Sucrose

10 mM Tris (pH 7.6)

5 mM MgCl₂

1% Triton X-100

DNA 萃取緩衝液：

10 mM Tris - HCl (pH 8)

10 mM EDTA (pH 8)

10 mM NaCl

0.3% SDS (sodium dodecyl sulfate)

經過濾，高壓蒸氣消毒後，保存在室溫。

酚溶液：含 0.1% 8-hydroxyquinoline

SEVAG 溶液：chloroform：isoamyl alcohol=24：1 (V/V)

TE 溶液：10 mM Tris (pH 8)

1 mM EDTA (pH 8)

經過濾，高壓蒸氣消毒後，保存在室溫。

(二) 實驗流程：

1. 10 ml 血液檢體（以含抗凝劑的採血管收集）以離心機離心 15 分鐘（1500 rpm），取中間層的白血球置於含 10 ml 紅血球溶解緩衝溶液的離心管內，搖晃均勻後再次離心 15 分鐘（1500 rpm）。
2. 倒掉上層紅血球溶解緩衝溶液，沉澱物再加入 5 ml 紅血球溶解緩衝溶液搖晃均勻以離心機離心 15 分鐘（1500 rpm）後，去除上層液體。將白血球取出置於 1.5 ml 微離心管，加入 500 μ l 的 DNA 萃取緩衝液。
3. 加入最終濃度 200 μ g/ml 蛋白質分解酵素（proteinase K, 20 mg/ml），混合均勻後置入 37°C 培養箱作用 24 小時以上，直到混合液呈均質澄清。
4. 加入與 DNA 萃取緩衝液等量體積的酚溶液，震盪均勻，在室溫下離心 15 分鐘（10000 rpm）。
5. 取上清液至一新 1.5 ml 微離心管，加入與 DNA 萃取緩衝液等體積的 SEVAG 溶液混合均勻，在室溫下離心 15 分鐘（10000 rpm）。
6. 取上清液至 1.5 ml 微離心管中加入 1 ml 的乙醇（100%），置於 -20°C 冰箱 20 小時，以沉澱 DNA。
7. 在 4°C 下離心 30 分鐘（10000 rpm）。

8. 去除上清液，加入 75% 乙醇清洗 DNA 沉澱物，重複步驟

7.。

9. 去除上清液，將 DNA 沉澱物乾燥，溶於適量的 TE 溶液中。

待 DNA 沉澱物完全溶解後，利用分光光度計測量 DNA 濃度及純度，以波長 260/280 nm 的紫外光測定。

10. 雙股 DNA 在波長 260 nm 下測定，一個 OD 值 (optical

density) 相當於 50 μ g/ml，因此由檢體 DNA 所測得的 OD

值可推算出檢體 DNA 的濃度，最後以 TE 溶液將檢體 DNA

濃度調至 0.5mg/ml，保存於 4°C。在純度方面，DNA 在波長

260/280nm 下所測得的比例約 1.8，若蛋白質含量過高則比值

會下降，反之 RNA 含量多比值會上升，必要時需要重新萃

取。

第三節 腫瘤組織 DNA 萃取

(一) 雷射捕捉顯微擷取腫瘤細胞

為確定實驗檢體的癌細胞含量大於百分之九十，本研究利用雷射捕捉顯微擷取技術 (Laser Capture Microdissection, LCM)

(Emmert-Buck et al., 1996)取得口腔癌細胞，方法概述如下：

石蠟包埋的口腔癌組織切片以蘇木素及伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain) 以確認腫瘤細胞位置，以 PixCell II/IIe 雷射顯微鏡捕捉儀 (Arcuturus Engineering, Mountain View, CA) 進行腫瘤細胞擷取。利用二氧化碳雷射 (carbon dioxide laser) 準確擷取視野下方切片中的腫瘤細胞至表面覆蓋熱塑性聚合膜 (thermoplastic film) (成份為乙烯醋酸乙烯共聚合物, ethylene vinyl acetate polymer) 的塑膠蓋 (plastic cap)。擷取過程雖經過雷射擊點，但因為是瞬間的升溫並透過熱塑性聚合膜的擷取，所以並不會對細胞中的 DNA、RNA 或蛋白質造成傷害(Bonner et al., 1997)。在本實驗中每個塑膠蓋上擊點約 2000 次，擷取組織切片上的腫瘤細胞，進行 DNA 萃取。

(二) 溶液配製：

DNA 萃取緩衝液 (LCM 組織 DNA 萃取用)：

10 mM Tris-HCl (pH 8)

1 mM EDTA

400 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K

1% Tween 20

(三) DNA 萃取實驗流程：

取上述 DNA 萃取緩衝液 70 μl 注入 0.6 ml 微量離心管內，將含擷取細胞的塑膠蓋緊壓入管口並以封口膜 (parafilm) 封緊。將管口朝下使管內 DNA 萃取緩衝液完全蓋滿在塑膠蓋上的細胞，再將處理好的微量離心管置入溫度為 56°C 的培養箱或烘箱內反應 24 小時以上。自烘箱取出後，以 95°C 加熱 5 分鐘使混合液中的蛋白質分解酵素 (proteinase K) 失去活性，然後置於 -20°C 冷凍櫃保存

。圖 4-1、圖 4-2 雷射捕捉顯微擷取的腫瘤細胞代表圖。

第四節 基因型檢測

基因型檢測是利用以藍 (FAM)、綠 (VIC)、黃 (NED) 三種螢光標定的引子 (primer) 進行聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。引子組包含 400 個微衛星標記 (microsatellite marker)，購自 Applied Biosystems 公司，進行全基因體 (genome-wide) 的檢測。400 個微衛星標記平均分佈於人類 22 對體染色體及 X 性染色體中，其平均分佈間距為 9.2 cM (centiMorgan)，異合性 (heterozygosity) 頻率平均值為 0.79，且皆為雙核苷酸重複序列 (di-nucleotide repeat sequence)。引子 (primer) 依標定的螢光種類及 PCR 產物的片段大小歸納為 28 組，以方便在 PCR 增幅後藉由不同的螢光顏色與產物大小，搭配進行多種 PCR 的檢測分析。因本研究之研究對象均為男性故將位於 X 性染色體上的微衛星標記未列入分析，因此實際列入此次檢測範圍的微衛星標記共 382 個。

(一) 多引子聚合酵素鏈鎖反應 (Multiplex PCR) :

Multiplex PCR 反應試劑 :

白血球 DNA (20ng/ μ l) 或 腫瘤檢體 DNA 引子 (一次 PCR 約 2~3 對引子)	20ng 5'端及 3'端引子 各 0.5pmol
去氧核苷三磷酸 (dNTP)	0.25mM
氯化鎂 (MgCl ₂)	2.5mM
10X PCR 緩衝液	1 μ l
聚合酵素 (Ampligold Taq)	0.5unit

加蒸餾水至反應總體積 10 μ l, 以 96 孔盤進行反應。

Multiplex PCR 反應條件 :

1. 聚合酵素活化	95°C, 12 分鐘
2. 變性 (denaturation)	94°C, 30 秒
3. 重鏈 (annealing)	55°C, 30 秒
4. 延展 (elongation)	72°C, 30 秒
步驟 2. ~ 步驟 4. 重複循環 12 次	
5. 變性 (denaturation)	89°C, 30 秒
6. 重鏈 (annealing)	55°C, 30 秒
7. 延展 (elongation)	72°C, 30 秒
步驟 5. ~ 步驟 7. 重複循環 47 次	

(二) Multiplex PCR 產物分析

將同組引子所增幅(amplification)的 PCR 產物以 1:2:1(FAM:VIC:NED)體積混合(約 10~20 種 PCR 產物),利用 ABI 377 序列分析儀 (PE Biosystems, Foster City, CA) 進行膠體電泳分析。

(三) ABI 377 序列分析儀實驗操作流程：

配製 5% 聚丙烯醯胺凝膠 (polyacrylamide gel)：

Urea 10.8 g

30% Acrylamide / Bis-acrylamide (19 : 1) (BDH) 4 ml

5X TBE 6 ml

加蒸餾水至 30 ml，攪拌至 urea 完全溶解後，過濾。

Ammonium persulfate 150 μ l

TEMED 21 μ l

操作流程：

(1) 製作聚丙烯醯胺凝膠：以 36 公分長的玻璃製作聚丙烯醯胺

凝膠，兩片玻璃中間以厚度 0.2 公厘的注膠隔片隔出空間，

將凝膠灌滿後以蝴蝶夾夾緊兩側，膠體上方並以隔片隔出尺

梳插入的空間。完成後以深色海綿墊覆蓋避光，待 1.5~2

小時後膠體凝固再進行下列步驟。

- (2) 玻璃板面檢查 (Plate check)：確認凝膠已完全凝固後，將膠體上方隔片取出，以尺梳面插入膠體（可利用 64 孔或 96 孔尺梳）約 0.1 公分深度為宜。以蒸餾水沾濕拭鏡紙把玻璃面擦拭乾淨，勿殘留水痕或異物以免影響分析。將膠體架上 ABI 377 序列分析儀專用膠架固定。開啟 ABI 377 序列分析儀主機電源待 5 秒後，開啟電腦主機電源使電腦與分析儀連線。將電泳緩衝液下槽固定後把膠架架上，關上機門進行檢查 (plate check)，確認此時的膠體不會出現雜訊。確認後架電泳緩衝液上槽及加熱板，以 1x TBE 緩衝液共約 1.5 公升注滿上下槽至指定刻度，點選軟體中的預熱程式 (Pre-run) 使膠體溫度到達 37°C 以上，需時約 20 分鐘。
- (3) 載入樣品 (sample loading)：膠體預熱中準備將以電泳膠分析的樣品，首先將樣品以 95°C 加熱 5 分鐘使 PCR 產物分開為單股，加熱完成後置於冰上維持單股狀態並儘快進行電泳分析。樣品注入前將預熱動作暫停，以 20ml 注射針筒把膠體的孔清洗數次去除因預熱所滲出的尿素和產生的氣泡，再利用八爪微量分注器載入約每孔 1 μ l 的樣品。注意樣品需確實載入孔內，若漏出會干擾其他樣品判讀。載入樣

品時以奇數排先行載入，約 3 分鐘預跑，再載入偶數排的樣品，此目的是為了減少樣品載入時微量滲漏的干擾。載入完成後蓋上緩衝液上槽的蓋子，以防止緩衝液蒸乾，啟動軟體進行電泳，電壓 3000V 共需時 2~2.5 小時。膠體電泳所得影像檔 (image) 再以 GENESCAN version 3.1 及 GENOTYPER version 2.5 電腦軟體進行分析。

(四) 失去異合性分析 (Loss of heterozygosity analysis, LOH analysis)

失去異合性 (LOH) 的判定：

白血球 DNA 利用聚合酵素鏈鎖反應 (PCR) 所得的產物經軟體分析後，若含有兩種不同長度的片段，則表示此個案在此標記 (marker) 位置是異型合子 (heterozygote)，也就是「情報個案」 (informative case)。反之，若只有一種長度的產物則屬同型合子 (homozygote)，也就是「非情報個案」 (non-informative case)。個案判定為異型合子者，以其白血球 DNA PCR 產物為基準，依下列公式計算：

$$R = \frac{\text{腫瘤檢體 A1 基因座峰面積 (peak area) / 腫瘤檢體 A2 基因座峰面積}}{\text{白血球 A1 基因座峰面積 / 白血球 A2 基因座峰面積}}$$

若 R 值大於 3 或小於 0.333，即判定腫瘤檢體 DNA 失去異合性。

圖 4-3、圖 4-4 為判定失去異合性代表圖。

(五) 微衛星序列不穩定 (Microsatellite instability, MSI)

微衛星序列不穩定 (MSI) 的判定：

在電腦軟體完成分析 PCR 產物後，若腫瘤檢體 DNA 出現與白血球 DNA 長度不同的 PCR 產物時，不論此個案在此標記為異型合子或同型合子，即判定腫瘤檢體 DNA 在此標記呈現微衛星序列不穩定。

圖 4-5、圖 4-6 為判定微衛星不穩定代表圖。

第五節 資料分析

一、失去異合性綜合指標

本研究以對偶基因缺失比率 (Fractional Allelic Loss, FAL) 來表示總染色體失去異合性的頻率 (Vogelstein et al., 1989)。FAL 指標是指在分析個案中所有具情報標記的染色體臂數中，其腫瘤基因體經判定為發生 LOH 的染色體臂頻率，其計算公式如下：

$$\text{FAL} = \frac{\text{腫瘤基因體發生 LOH 的染色體臂個數}}{\text{研究個案中含有情報標記的染色體臂個數}}$$

二、微衛星序列不穩定的指標

依 Boland 等在 1998 年所提出大腸直腸癌的微衛星序列不穩定之定義中 (Boland et al., 1998)，該定義所選用的標記中有 30% 以上 (例如：若選用 5 個標記其中有 2 個或 2 個以上的標記出現微衛星重複序列改變的情形) 出現 MSI 的情形即定義為 MSI-H (microsatellite instability - high)，介於 0-30% 之間定義為 MSI-L (microsatellite instability - low)，若無 MSI 的情形則定義為 MSS (microsatellite stable)。本研究個案腫瘤基因體微衛星序列不穩定之評估標記為 377 個，因此若個案有 114 個 (含以上) 標記呈現 MSI 即為 MIN 個案。

三、統計分析

以 SAS 統計軟體進行失去異合性及微衛星序列不穩定之統計分析，包括各腫瘤組織總染色體臂、各染色體臂及各微衛星序列標記失去異合性與微衛星序列不穩定之頻率，並以卡方 (Chi-square) 或費雪精確檢定法 (Fisher's exact test) 進行腫瘤部位與各微衛星序列標記失去異合性及微衛星序列不穩定之相關性檢定。

第五章 結果

本研究以林口長庚紀念醫院耳鼻喉科部進行手術的 30 位男性口腔癌個案為對象，採集術前靜脈血及腫瘤組織，萃取 DNA，進行失去異合性與微衛星序列不穩定分析。分析標記總數為 382 個，分別分佈於 22 對體染色體 39 個染色體臂。其中有 5 個標記 D7S2465、D8S285、D13S156、D17S784 及 D18S64 因 PCR 反應的條件或其他因素，並沒有成功的增幅，因此本研究實際分析的標記總數為 377 個。

第一節 台灣地區口腔癌腫瘤組織失去異合性的特徵

一、各腫瘤組織總染色體臂失去異合性的頻率

各腫瘤組織總染色體臂 LOH 的頻率是以 FAL 指標表示，以反映每個腫瘤發生 LOH 的程度(Vogelstein et al., 1989)。在 30 個口腔癌腫瘤組織中，總染色體臂 LOH 的頻率最小值為 0.486 最大值為 0.872(表 5-1)。FAL 指標平均值 (mean) 為 0.645 顯示口腔癌組織在 39 個染色體臂中有 64.5% 的染色體臂發生 LOH。

二、各染色體臂失去異合性頻率

依各染色體臂分別計算其 LOH 頻率 (圖 5-1)。本研究口腔癌檢體染色體臂 LOH 頻率最高者者為 17p(0.443)，最低者為 19q(0.159)，

LOH 頻率平均為 0.256 (25.6%)，中間值為 0.246 (24.6%)。LOH 頻率大於 26% 的染色體臂有 1q、2q、3p、4p、4q、5p、5q、6q、8p、8q、12p、14q、17p、19p。

三、各微衛星序列標記失去異合性頻率

本研究針對 30 個口腔癌檢體進行 377 個微衛星序列標記失去異合性分析。其中標記分析成功個案 ≥ 20 且異合性 $\geq 50\%$ 的標記數有 208 個。在此 208 個微衛星序列標記中，LOH 頻率 $\geq 40\%$ 的標記數有 26 個 (12.5%)，列於表 5-2。依序為 D10S537 (62.5%)、D17S799 (61.5%)、D14S258 (60%)、D7S640 (58.3%)、D19S216 (57.1%)、D9S287 (54.6%)、D1S2868 (50%)、D1S2836 (50%)、D4S415 (50%)、D6S1581 (50%)、D20S178 (47.6%)、D2S142 (47.1%)、D19S210 (47.1%)、D8S260 (46.7%)、D13S173 (46.7%)、D2S2211 (43.8%)、D1S199 (42.1%)、D2S160 (42.1%)、D5S424 (42.1%)、D2S325 (41.7%)、D6S441 (41.2%)、D9S290 (41.2%)、D14S275 (41.2%)、D5S400 (40.9%)、D4S403 (40%) 及 D13S217 (40%)。主要分佈在染色體 1p (1p21.3、1p35-36.1)、1q (1q44)、2p (2p25)、2q (2q23.2、2q12.1、2q34)、4p (4p15.33)、4q (4q34.1)、5q (5q13.2、5q34-35)、6q (6q25、6q24.3)、7q (7q31.3)、8q (8q12-13)、9q (9q22.2、9q34.1)、

10q (10q21.3-22)、13q (13q32-34、13q12)、14q (14q23-24、14q11.2-13)、17p (17p12-13) 及 19p (19p13.2)。

四、染色體區段失去異合性頻率

本研究 377 個微衛星序列標記失去異合性的頻率平均值為 0.24，失去異合性頻率 ≥ 0.24 的標記數共 199 個。依其在染色體所在位置，其中失去異合性較具一致性的區段共有 48 個，分別位於 1q、2q、4p、4q、5p、5q、6q、7p、7q、8p、9q、10q、11q、12q、13q、14q、17p 及 19p 共 18 個染色體臂。此 48 個染色體區段 LOH 頻率平均值為 0.457 (45.7%)，LOH 頻率最高的區段為 5q34-35 (0.773, 17/22)。依失去異合性頻率將 LOH 頻率 $\geq 46\%$ 的區段列於表 5-3。主要分佈在 5q34-35、17p12-13、16q22-24、19p13、2q21-24、4q21-28、14q11-13、10q21-23、12q24、13q12、7q31、5q13-15、11q22-25、13q31-34、8p23-22、8q22-24、14q23-24、6q23-25、1q23、9q22、4p15-16、2q34-36 及 9q34 共 23 個區段。

五、腫瘤部位與微衛星序列標記失去異合性之相關性

本研究口腔癌個案腫瘤發生部位為舌及頰膜兩處，因此進一步分析舌癌與頰膜癌在各微衛星序列標記發生 LOH 是否具共同性及特異

性。在所分析的 377 標記中，不論舌癌或頰膜癌 LOH 頻率均 $\geq 40\%$ 的標記有 28 個（表 5-4）。LOH 頻率在舌與頰膜癌間相差 50% 以上的標記有 9 個（表 5-5），其中屬舌癌 LOH 特異性的標記有 5 個，分別是 D3S1311、D5S2027、D8S258、D12S368 及 D14S985，分佈在染色體 3q24、5q21、8p22、12q13 及 14q32。另外 4 個標記為頰膜癌所特有，分別是 D1S2878、D1S199、D5S424 及 D6S308，分佈在染色體 1q23、1p35、5q13.2 及 6q23。進一步將舌癌與頰膜癌專一性的標記組成兩個標記群，並定義個案在各標記群中有一個以上（含一個）發生 LOH 即屬 LOH 個案，發現此兩標記群之 LOH 頻率與腫瘤部位有密切的相關性（表 5-6）。

六、腫瘤分期與微衛星序列標記失去異合性之相關性

本研究中個案之腫瘤分期所佔比例為第一期 10% (3/30)、第二期 33.33% (10/30)、第三期 10% (3/30)、第四期 46.67% (14/30)。由於研究樣本數小，因此將第一及第二期合併為早期，第三及第四期合併為晚期。在所分析的為衛星標記中，發現有二個微衛星標記 (D6S1581 及 D17S785) 之失去異合性與腫瘤分期具統計顯著相關性；此二標記之 LOH 頻率在腫瘤晚期顯著增高。另外發現三個微衛星標記 D9S1677、D17S799 及 D19S418 屬早期具 LOH 特異性的標記

(表 5-7)。進一步將腫瘤分期專一性標記區分為兩標記群，針對兩標記群均為情報個案進行相關性分析，發現屬晚期專一性之標記群在腫瘤分期達統計顯著相關性 (表 5-8)。

七、喝酒與微衛星序列標記失去異合性之相關性

由於本研究個案 90% 以上均有抽菸及嚼檳榔之習慣，因此僅能探討喝酒對失去異合性的影響，發現 D18S478 及 D17S799 二標記之 LOH 頻率在有喝酒史的個案中顯著高於沒有喝酒史的個案；另外有四個標記 D3S1304、D6S289、D9S167 及 D10S1693 屬無喝酒史個案之特異標記 (表 5-9)。進一步將屬有喝酒史專一性標記區分為二標記群，針對兩標記群均為情報個案進行相關性分析，發現屬喝酒專一性標記群達統計顯著相關性 (表 5-10)。

第二節 台灣地區口腔癌患者微衛星序列不穩定特徵

本研究針對 30 個口腔癌檢體進行 377 個微衛星序列不穩定分析，發現腫瘤組織 MSI 頻率最高為 0.631 (128/203)，最低為 0.123 (35/284) (表 5-11)。依 Boland 等所建議之定義，評估台灣地區口腔癌腫瘤基因體微衛星序列不穩定的頻率。在此 30 個口腔癌研究個案，腫瘤微衛星序列不穩定的頻率為 63.3% (19/30)。

以評估染色體臂失去異合性的模式評估各染色體臂微衛星不穩定的頻率。如圖 5-2 所示，最常見微衛星不穩定的染色體臂為 16q (80% , 24/30) 最少見微衛星序列不穩定的染色體臂為 13q (33.3% , 10/30)。染色體臂微衛星序列不穩定之頻率平均值為 59.6%。其中染色體臂微衛星序列不穩定頻率大於 60% 的染色體臂依序為 16q、3q、1q、7q、22q、5p、5q、4p、6p、21q、1p、2p、2q、3p、8p、11p、12q、6q、9p、15q、17q。

在 30 個口腔癌組織微衛星序列不穩定分析中，標記分析成功個案 ≥ 20 的微衛星序列標記有 227 個。最常見微衛星不穩定的標記為 D3S1580 (95.5% , 21/22)，此標記位於 3q27。其次依序為 D19S220 (80.0% , 16/20)、D1S450 (75.0% , 15/20)、D2S367 (75.0% , 15/20)、D22S315 (73.1% , 19/26)、D1S2800 (69.2% , 18/26)、D6S422 (66.7% , 14/21)、D5S419 (66.7% , 14/21)、D6S460 (66.7% , 13/20)、

D2S335 (65% , 15/24) (表 5-12)。

分析各染色體臂微衛星序列不穩定比率與腫瘤部位的相關性，發現染色體臂 11q 在舌癌有特異的微衛星序列不穩定現象。舌癌在 11q 之微衛星序列不穩定頻率為 78.6% (11/14)，頰膜癌在 11q 之微衛星序列不穩定頻率為 25% (4/16)，兩者間達統計顯著差異 ($P=0.003$)。

進一步分析各微衛星序列標記不穩定現象與腫瘤部位的相關性。在所分析的 377 個微衛星標記中，其中屬舌癌特異性的微衛星序列不穩定標記有 2 個：分別是 D5S424 及 D11S925，分別位於染色體 5q13 及 11q23。另外有 6 個微衛星序列不穩定標記為頰膜癌所特有，分別是 D1S452、D3S1289、D6S422、D7S507、D9S171 及 D20S115，分佈在染色體 1q21-23、3p21、6p22、7p15、9p21 及 20p12 (表 5-13)。

第六章 討論

本研究以男性口腔癌個案為研究對象，以 377 個微衛星標記進行全基因體掃描，來探討口腔癌腫瘤組織基因體失去異合性及微衛星序列不穩定的特徵。本研究與其他有關頭頸部腫瘤基因體失去異合性的研究相較（表 6-1）(Ah-See et al., 1994; Beder et al., 2003; Field et al., 1995; Nawroz et al., 1994)。在研究方法方面，先前研究的腫瘤組織並沒有如本研究經過顯微擷取（microdissection）步驟挑選較易因含有非腫瘤組織而低估 LOH 的頻率。在基因型判讀上，先前的研究是以 ^{32}P 標定或銀染的方式來判讀。本研究是利用螢光標定並以 GeneScan 及 Genotyper 軟體進行分析，因此在結果判讀上應較為精確。

在標記數量選擇上，先前的研究所選用的標記數較少，分別為 50 個、58 個、145 個及 191 個。在低於 100 個標記的研究，每個染色體臂所選用的標記數量相當少，平均一條染色體臂只選用 1-2 個標記，可能會導致許多 LOH 位置無法被發現。在標記數大於 100 的研究中，已知存在抑癌基因的染色體臂或區段分配較多的標記，較易造成研究結果的偏頗。本研究以 377 個微衛星標記做全基因體掃描，分別分佈在 39 個染色體臂上，平均約每 10 cM 一個標記，所得的結果應較具全面性。

表 6-1 口腔癌及頭頸癌全基因體失異合性研究

作者	年代	國家	LCM	標記數	樣本數	腫瘤部位	檢測方式	LOH 檢測結果
Nawroz et al. (1994)		美國	無	58	29	未註明	³² P 標定	染色體臂 9p 的 LOH 頻率最高 72% (21/29), 第三號染色體及 11q、13q、17p 的 LOH 頻率皆大於 50% ; 第四、八號染色體及 6p 與 14q 之 LOH 頻率介於 35-50% 之間。LOH 頻率較高染色體臂為 3p (44%)、5q (43%)、9q (35%)、11q (45%) 及 17p (31%)。
Ah-See et al. (1994)		英國	無	50	28	未註明	³² P 標定	LOH 頻率大於 45% 的染色體臂: 3p、9p、17p、18q; LOH 頻率 20-40% 位置: 1p、1q、2p、5q、6p、6q、8p、8q、9q、11q、13q、17q、19q。FAL 值與腫瘤分期、是否轉移有統計上的相關性, 且 FAL 值較高患者預後也較差顯示 LOH 頻率隨腫瘤急性度增加而增加。
Field et al. (1995)		英國	無	145	80	未註明	銀染法	LOH 頻率大於 40% 染色體臂: 3p、9p、13q、15q、17p; LOH 頻率大於 20-40% 位置: 2q、3q、4p、4q、5q、8p、8q、9q、10q、11p、11q、14q LOH 較高之染色體區段: 2q33、2q22-23、2q37、4p15.2、4q24-25、5q31.3、8p23.2、8q13.1、8q24、9p23-24、9q31.3、9q34.2、10q21、11q21-22.3、14q11-13、14q22.3、17p13、18q11、19q12。
Beder et al. (2003)		日本	無	191	22	口腔 下咽 口咽 喉 下頷骨	銀染法	最常發生 LOH 的染色體臂 (44.3-26.3%): 17p、8q、19p、5p、14q、2q、12p、16q、4q、8p、5q、4p、1q、3p、6q。LOH 頻率 (77-52%) 較高的染色體區段依序為: 5q34-35、17p12-13、16q22-24、19p13、2q21-24、4q21-28、10q21-23、12q24、13q12、7q31 及 5q13-15。
本研究 (2003)		台灣	有	377	30	口腔 (舌) (頰膜)	螢光標定	

本研究發現台灣地區口腔癌組織最常發生 LOH 的染色體臂依序是 17p (44.2%)、8q (35.1%)、19p (31.9%)、5p (31.5%)、14q (31.3%)、2q (30%)、12p (29.9%)、16q (29.6%)、4q (29.4%)、8p (29.3%)、5q (28.9%)、4p (28.8%)、1q (28.5%)、3p (28.4%)、6q (26.3%) (圖 5-1)，此結果與先前研究的結果有某些程度上的共同性。其中最具一致性失去異合性的染色體臂為 17p。在先前的研究，LOH 的頻率均大於 40% ，此結果與本研究的結果一致。顯示染色體臂 17p 是口腔癌或頭頸癌好發 LOH 的染色體臂。在其他的染色體臂如 8q (35.1%)、14q (31.3%)、2q (30%)、5q (28.9%)、4p (28.8%)、1q (28.5%)、6q (26.3%) 及 1p (21.8%) 也呈現一致性的結果。但本研究也有與先前研究的結果不盡相同之處。推測可能的原因如下：

- (1) 如上所述，研究方法策略不同，可能獲得的結果不同。
- (2) 研究對象種族的差異。
- (3) 所暴露的危險因子不同，台灣地區口腔癌的危險因子為嚼檳榔、抽菸及飲酒。而先前的研究，主要的危險因子為抽菸及飲酒。
- (4) 不同腫瘤部位。都有可能造成結果的差異。本研究發現在染色體臂 7q (26.0%) 頻率頗高，但在先前全基因體研究中並沒有類似的發現。不過在非全基因體的研究中，有類似的發現，如 Grati 等的研究發現染色體臂 7q LOH 情形達 50% (Grati et al., 2000) ，同時 Ng 等對香港地區的華人所做的研究也發現染色體臂 7q 有 LOH

情形 (14%) (Ng et al., 2000), 另外, 染色體臂 7q LOH 的情形也常見於乳癌、前列腺癌、胰臟癌、卵巢癌及大腸癌等 (Achille et al., 1996; Zenklusen, Bieche et al., 1994; Zenklusen, Thompson et al., 1995; Zenklusen, Thompson et al., 1994; Zenklusen, Weitzel et al., 1995)。

本研究中發現台灣地區口腔癌失去異合性較高的微衛星序列標記依序為 D10S537 (62.5%)、D17S799 (61.5%)、D14S258 (60%)、D7S640 (58.3%)、D19S216 (57.1%)、D9S287 (54.6%)、D1S2868 (50%)、D1S2836 (50%) 及 D4S415 (50%) (表 5-2)。這些高頻率失去異合性之標記所在位置所含的基因包括已知的抑癌基因如 p53 基因 (D17S799)、PTEN 基因 (D10S537) 或 DNA 修補基因如 RAD51B 基因 (D14S258) 及 XPA 基因 (D9S287)。除 D1S2868 (1p21.3)、D1S2836 (1q44)、D4S415 (4q34.1) 及 D19S216 (19p13.12) 外, 其餘的微衛星序列標記 LOH 頻率都較先前的研究高。這些差異的可能原因, 也許是本研究中腫瘤組織經 LCM 挑選使判讀結果較精確, 或是研究中選用標記不同、種族差異或致癌危險因素不同所致。

研究中歸納 LOH 頻率較高的染色體區段依序為 5q34-35 (77.3%)、17p12-13 (74.1%)、16q22-24 (62.5%)、19p13 (61.9%)、2q21-24 (60.7%)、4q21-28 (59.3%)、10q21-23 (57.1%)、12q24 (56.0%)、13q12 (55.2%)、7q31 (54.2%) 及 5q13-15 (51.9%) (表 5-3)。5q34-35

(77.3%) 是台灣地區口腔癌失去異合性頻率最高的染色體區段，但在先前的研究並未被討論過，或許有一與檳榔嚼食致癌有關的未知抑癌基因存在此區段，但需擴大樣本數做進一步確認。台灣地區口腔癌在染色體 17p12-13 區段失去異合性頻率高達 74.1%，已知在這個區段中有一重要的抑癌基因 *p53*。先前的研究也發現 *p53* 基因在口腔癌或頭頸癌有高比率 LOH 的情形(Adamson et al., 1994)，顯示出 *p53* 基因在口腔癌或頭頸癌的重要角色。除 *p53* 基因外，本研究發現在多種抑癌基因的鄰近區段有高頻率 LOH 的現象，如 *Rb* 基因所在染色體區段 13q12 附近，LOH 頻率為 55.2%。雖然在先前的頭頸部腫瘤研究，*Rb* 基因 LOH 的頻率並不高(Yoo et al., 1994)，但在嚼檳榔及抽菸相關的腫瘤研究發現有變異的 *Rb* 蛋白表現(Pande et al., 1998)。本研究 90% (27/30) 口腔癌個案皆有嚼檳榔及吸菸的習慣，*Rb* 基因在這類腫瘤的角色值得進一步探討。

PTEN 基因所在位置 10q21-23 LOH 頻率也頗高，PTEN 基因或其鄰近未知的抑癌基因在台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌的角色需擴大樣本數加以釐清。Pershouse 等在頭頸部腫瘤的研究，發現染色體區段 4q25 約有 75% 的 LOH 頻率。1999 年 Wang 等在口腔癌組織，進行第四號染色體失去異合性分析，發現此區段有 45% 的 LOH 頻率。本研究發現此區段 (4q21-28) LOH 頻率為 57.1%，與先前的研究結

果一致，顯示此區段可能有一抑癌基因存在，同時此一抑癌基因可能在台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌的形成過程中扮演一重要角色。

本研究在 9p21 鄰近區段的 LOH 頻率為 38.9% (7/18) 較先前研究的結果 (75%) 低。此種差異可能是由於各地區口腔癌或頭頸癌的危險因子不同、不同的腫瘤部位或種族差異所致。此區段含有 p16 基因，在許多頭頸癌的研究，發現 p16 基因易失去異合性致基因不表現。根據本實驗室檢測口腔癌 p16 基因啟動子高度甲基化的初步發現，在 9p21 區段無失去異合性的 11 個腫瘤中，36.4% (4/11) 的腫瘤在 p16 基因啟動子有高度甲基化現象。因此台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌 p16 基因失去功能的機制包括失去異合性及啟動子高度甲基化兩種。

本研究亦發現許多 DNA 修補機制相關基因所在區段發生 LOH，如與 DNA 雙股斷裂修補機制 (DSBR) 相關的 ATM (11q22-25)、BRCA1 (17q21-22)、RAD51 (15q14)、RAD51B (14q23-24) 及 XRCC3 基因 (14q32)；與錯配修補機制 (MMR) 相關的 MSH3 (5q13-15) 基因；鹼基剪除修補系統中的 APE1 (14q11-13) 與 OGG1 基因 (3p26)；與核苷酸剪除修補系統的 XPF (ERCC4) 基因 (16p12-13)。許多 DNA 修補機制相關基因發生 LOH，暗示 DNA 修補系統在台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌的癌化過程中可能扮演一重要角色，值得進一步深入探討。本研究發現不同腫瘤部位之口腔癌，失去異合性的微衛星序列標

記有其特異性 (表 5-5)，在舌癌具特異性的標記有五個：D3S1311、D5S2027、D8S258、D12S368 及 D14S985，在頰膜癌具特異性的標記有四個：D1S2878、D1S199、D5S424 及 D6S308。其中 D8S258 標記附近有 LZTS1 基因，1999 年 Ishii 等在食道癌發現有 LZTS1 基因 LOH 的情形(Ishii et al., 1999)，2001 年更進一步發現此基因具有調控細胞生長的功能，當此基因失去功能時細胞會不正常增生(Ishii et al., 2001)。D3S1311 附近有一 OPA1 基因，其功能與細胞的凋亡有關 (Olichon et al., 2003)。D5S2027 附近有 APC 基因，此基因在台灣地區口腔癌失去異合性的比率為 29-54% (Chang et al., 2000; Huang et al., 1997)。在 2002 年 Kok 等的研究指出台灣地區口腔癌 APC 基因的突變與嚼食檳榔及抽菸有關(Kok et al., 2002)。由於本研究的樣本數相當小，因此對於這些腫瘤部位特異性標記應進一步擴大樣本數釐清。

本研究發現二個微衛星標記 D6S1581 及 D17S785 屬腫瘤晚期的特異性標記 (表 5-8)。D6S1581 附近有 M6P/IGF2R 基因，約 30-50% 的乳癌、肺癌及肝癌組織在 M6P/IGF2R 基因失去異合性(De Souza et al., 1995; Hankins et al., 2003; Kong et al., 2000)。M6P/IGF2R 為一多重功能性的蛋白，包括活化 TGF-beta、抑制細胞生長及降解 IGF2 等功能(De Souza et al., 1995)。Jamieson 等發現 M6P/IGF2R 基因失去異合性的頭頸部腫瘤個案預後較差(Jamieson et al., 2003)。由於

M6P/IGF2R 基因被認為是頭頸部腫瘤可能的重要抑癌基因，此基因在台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌所扮演的角色，值得進一步深入探討。

D17S785 附近有一 DNC 基因，是一運送合成粒線體 DNA 所需去氧核苷三磷酸 (dNTP) 進入粒線體基質的載體蛋白。另外，本研究發現 D18S478 及 D17S799 兩標記為喝酒致口腔癌之特異性標記 (表 5-10)。D17S799 位於 p53 基因附近，此結果顯示 p53 基因在台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌致癌機轉上扮演著相當重要的角色。

本研究依據大腸直腸癌 MIN 之定義評估口腔癌腫瘤基因體微衛星序列不穩定情況，發現本系列研究個案 MIN (+) 的比率 (63.3%) 較過去非全基因體研究所發現的比率 (3-40%) 高。探討其可能原因有 (1) 標記不同 (2) 致癌之危險因子不同 (3) 不同腫瘤部位 (4) 腫瘤組織有無經過顯微擷取，雖然本研究沒有檢測錯配修補機制基因 (如 hMLH1、hMSH2 等) 的基因變異，但發現許多 DNA 修補基因區段的有失去異合性的現象，其中包括 hMSH2 及 hMSH3 基因。台灣地區口腔癌組織是否因錯配修補機制基因失去功能性而出現高頻率的微衛星不穩定，值得進一步探討。各染色體臂微衛星不穩定頻率之平均值為 59.5%，其中頻率超過 60% 的染色體臂共 23 個，包括已知常見的微衛星序列不穩定 3p、6p、7q、9p、11p。另外，本研究發現染色體臂 11q 是舌癌特異的微衛星不穩定染色體臂，發生頻率達

78.6% (11/14)，而在頰膜癌的頻率僅為 25% (4/16) 此現象是否有其特殊意義，值得進一步探討。與失去異合性相同，在微衛星序列不穩定方面本研究也發現具腫瘤部位特異性的微衛星序列不穩定標記 (表 5-13)。分別是屬於舌癌的特異性標記 D5S424 及 D11S925，屬於頰膜癌特異性的標記 D1S452、D3S1289、D6S422、D7S507、D9S171 及 D20S115。其中 D11S925 附近有 ATM 基因、D5S424 附近有 MSH3 基因都是與 DNA 修補相關基因，另外 D3S1289 附近有 MLH1 基因、D20S115 附近有一與氣喘相關的 ATOD3 基因(Cookson et al., 2001)，其相關性都需再進一步研究釐清。在頰膜癌特異性標記 D9S171 附近有 p16 基因，2000 年 Mahale 等針對印度地區有長期嚼食菸草習慣的口腔癌患者 (54.5% 為頰膜癌個案) 所做的研究，發現 9p21 位置有微衛星序列不穩定及失去異質性但前者佔較次要角色(Mahale et al., 2000)，而本研究的結果是否顯示 p16 基因是頰膜癌形成過程中較重要的基因，此一相關性值得進一步探討。

本研究利用雷射捕捉顯微擷取的技術擷取石蠟包埋組織中的腫瘤細胞，此種方法雖然可以使腫瘤細胞達到較高純度 DNA，但所萃取之 DNA 容易斷裂，不容易以 PCR 增幅 250 個鹼基對以上的基因產物。另外 DNA 可能因為量少且未經純化，因此 PCR 的產物明顯較白血球 DNA 所增幅的產物訊號弱。建議未來宜以新鮮組織取代石蠟包

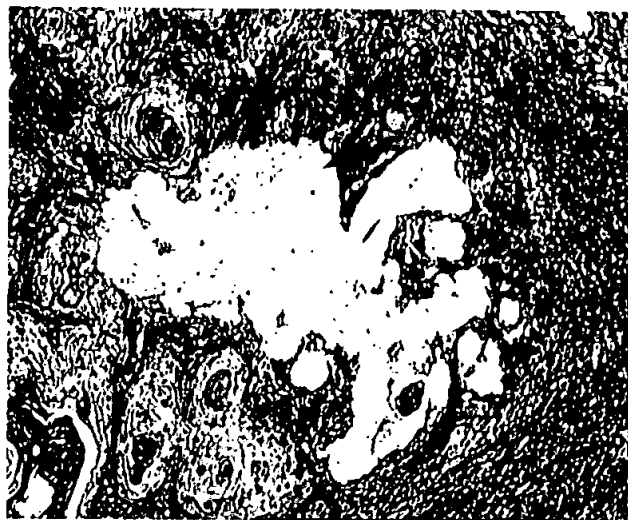
埋組織，同時提高擷取細胞數，以增加腫瘤細胞 DNA 量並提昇其品質。

結論

本研究利用微衛星標記探討台灣地區口腔癌失去異合性及微衛星序列不穩定之特徵，獲得以下結論。(1) 口腔癌或頭頸癌常見失去異合性的染色體臂包括 17p、8q、14q、2q、5q、19p、4p、6q。(2) 台灣地區口腔癌較特異的失去異合性染色體臂為 7q。(3) p53 基因所在染色體位置 17p12-13 區段為高度失去異合性區段，顯示 p53 基因在台灣地區口腔癌形成過程扮演一重要角色。(4) 在失去異合性方面，具舌癌專一性的微衛星序列標記有 D3S1311、D5S2027、D8S258、D12S368 及 D14S985；具頰膜癌專一性的微衛星序列標記有 D1S2878、D1S199、D5S424 及 D6S308。(5) 在微衛星序列不穩定部分，發現台灣地區口腔癌腫瘤基因體呈現高頻率微衛星序列不穩定現象。(6) 相較於頰膜癌，舌癌在染色體臂 11q 有相當高頻率微衛星不穩定現象，且屬於舌癌的特異性微衛星序列不穩定標記為 D5S424 及 D11S925，屬於頰膜癌特異性的標記 D1S452、D3S1289、D6S422、D7S507、D9S171 及 D20S115。(7) 在 DNA 修補基因鄰近區段發現高頻率的失去異合性其中包括錯配修補基因，可能是造成微衛星序列不穩定頻率較高的原因。



(A)



(B)



(C)

圖 4-1 雷射捕捉顯微擷取的腫瘤細胞代表圖 (一)

(A) 擷取前 (箭號所指為癌組織)

(B) 擷取後

(C) 擷取之腫瘤細胞



(A)



(B)



(C)

圖 4-2 雷射捕捉顯微擷取腫瘤細胞代表圖 (二)

(A) 擷取前 (箭號所指為癌組織)

(B) 擷取後

(C) 擷取之腫瘤細胞

OR005

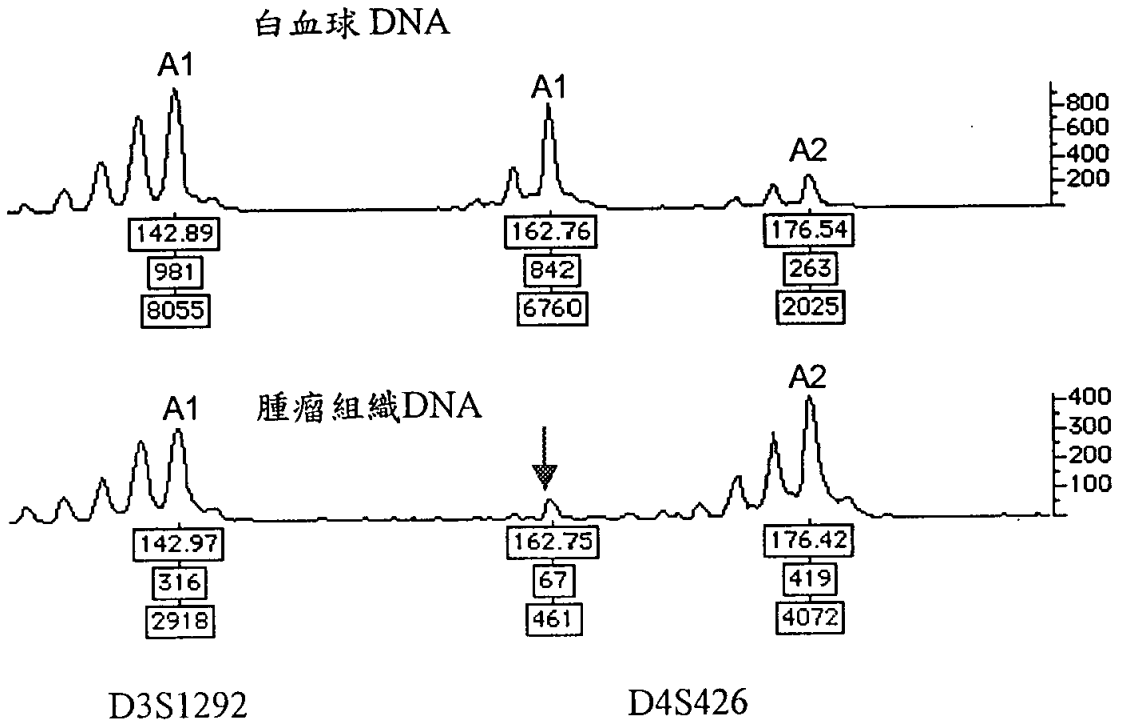


圖 4-3 失去異合性代表圖 (一)

口腔癌個案 OR005 之白血球及腫瘤組織 DNA，以 D3S1292 及 D4S426 微衛星序列標記分析之圖譜，箭頭所指為失去異合性之對偶基因。

OR077

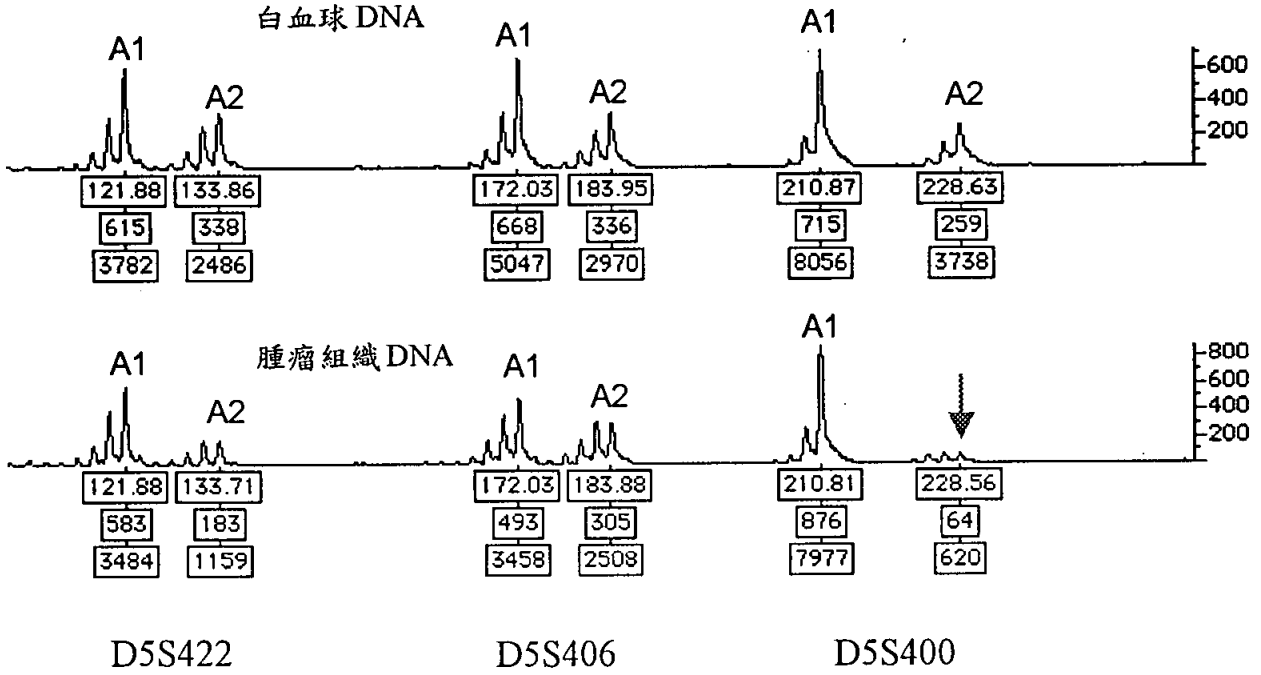


圖 4-4 失去異合性代表圖 (二)

口腔癌個案 OR077 之白血球及腫瘤組織 DNA，以 D5S422、D5S406 及 D5S400 微衛星序列標記分析之圖譜，箭頭所指為失去異合性之對偶基因。

OR 006

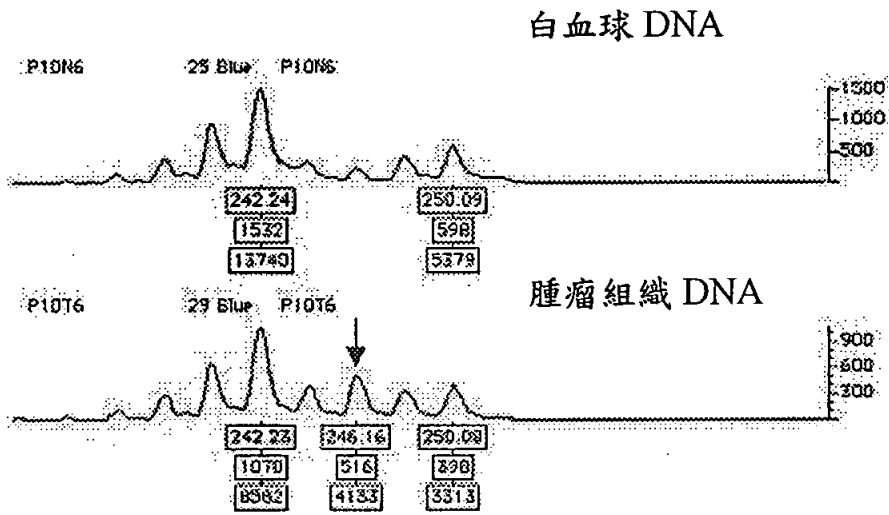
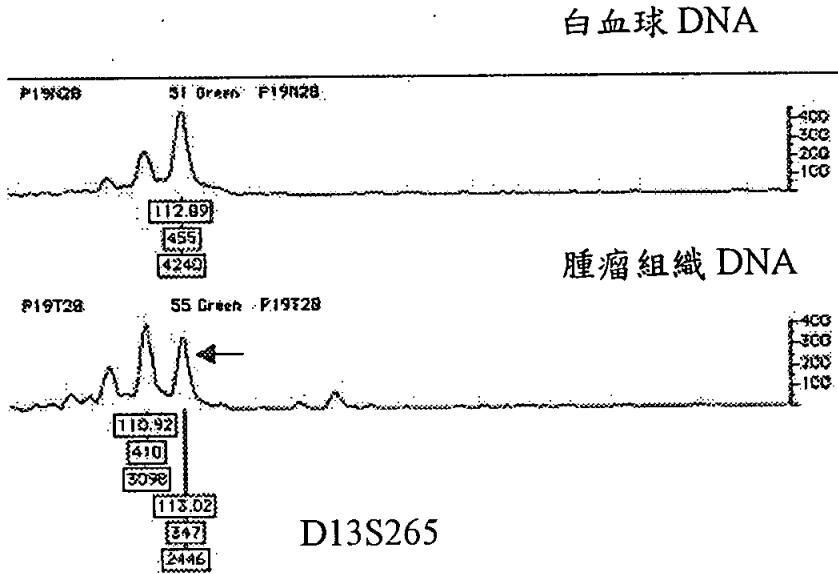


圖 4-5 微衛星序列不穩定代表圖 (一)

口腔癌 OR 006 個案之白血球及腫瘤組織 DNA，以 D5S463 微衛星序列標記分析之圖譜，箭頭所指為微衛星序列呈現不穩定之對偶基因。

(A) OR 028



(B) OR 006

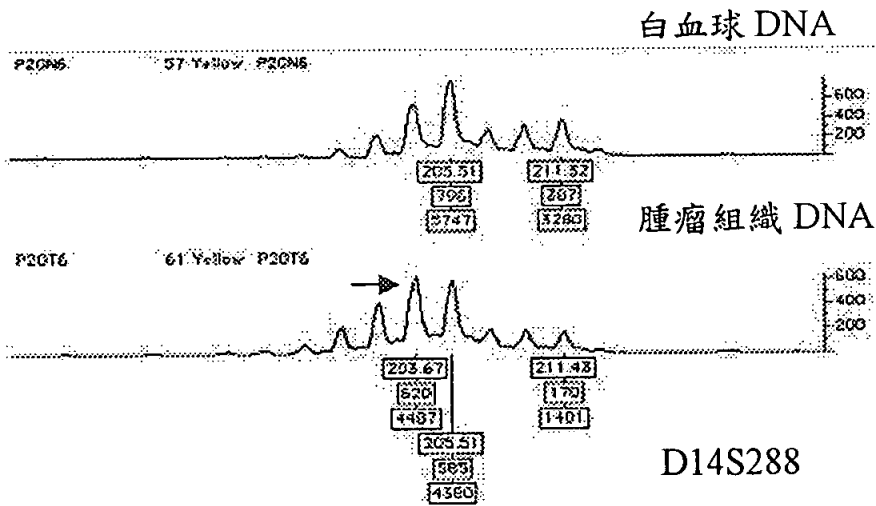


圖 4-6 微衛星序列不穩定代表圖 (二)

(A) 口腔癌 OR 028 個案之白血球及腫瘤組織 DNA，以 D13S265 微衛星序列標記分析之圖譜，箭頭所指為微衛星序列呈現不穩定之對偶基因。

(B) 口腔癌 OR 006 個案之白血球及腫瘤組織 DNA，以 D14S288 微衛星序列標記分析之圖譜，箭頭所指為微衛星序列呈現不穩定之對偶基因。

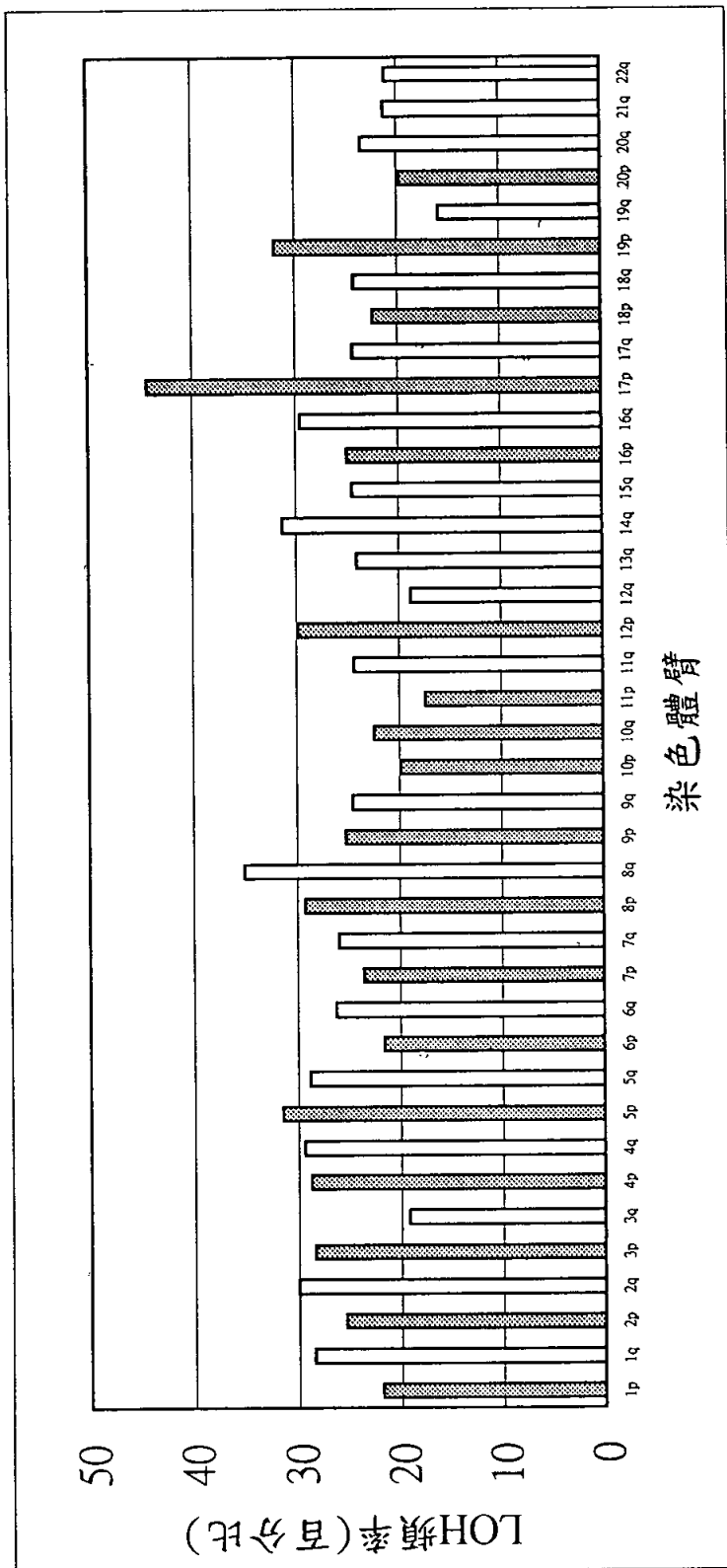


圖 5-1 口腔癌組織各染色體臂 LOH 頻率分佈圖

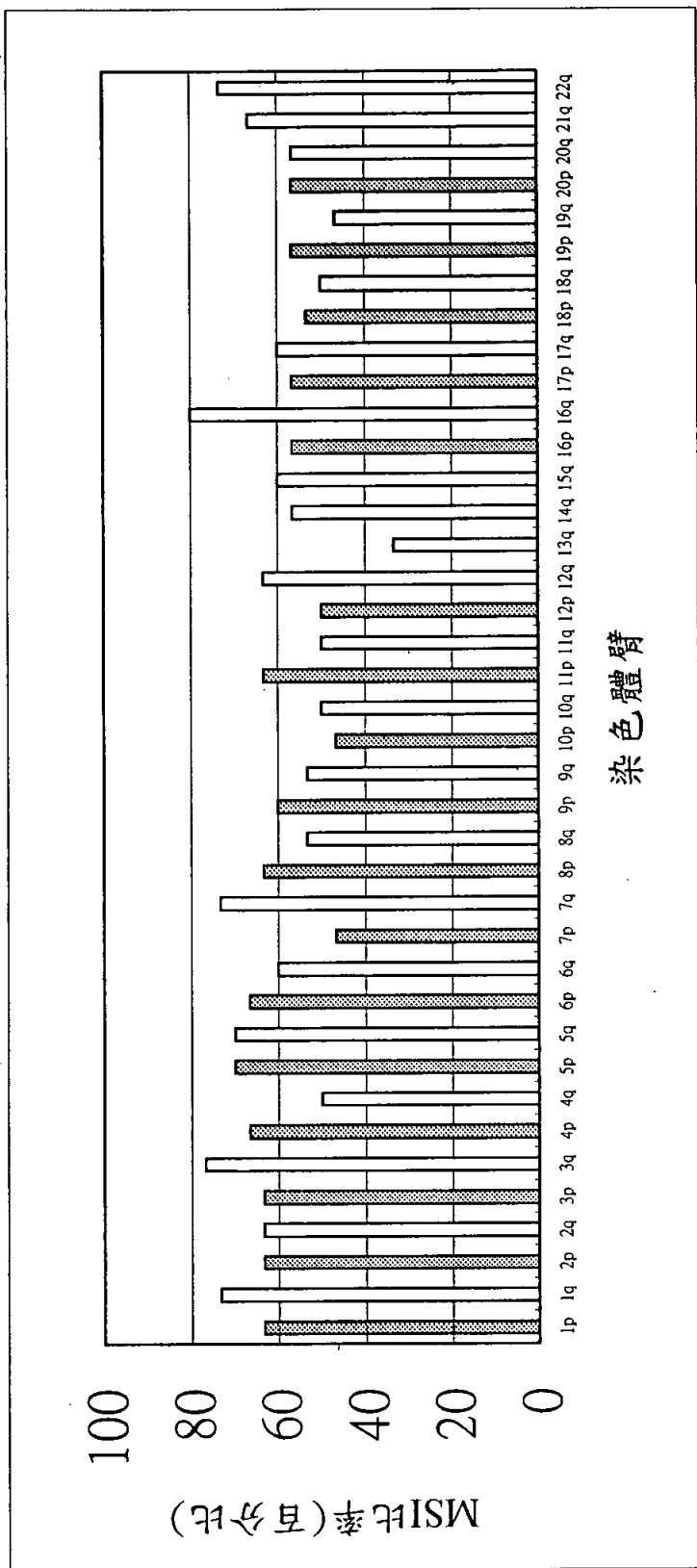


圖 5-2 口腔癌組織各染色體臂 MSI 頻率分佈圖

表 5-1 口腔癌組織總染色體臂 LOH 頻率分佈表

個案編號	年齡 (歲)	抽菸 ^a	喝酒 ^a	嚼檳榔 ^a	腫瘤 ^b 部位	腫瘤分期	FAL 值 (LOH 染色體臂數/ 情報染色體臂數)
5	58	1	1	1	1	4	0.579 (22/38)
6	56	1	1	1	1	1	0.486 (18/37)
21	39	1	1	1	0	4	0.718 (28/39)
24	44	1	1	1	0	1	0.692 (27/39)
28	54	1	1	1	1	4	0.564 (22/39)
30	46	1	0	1	1	4	0.744 (29/39)
34	45	0	1	1	0	4	0.769 (30/39)
35	38	0	1	1	0	2	0.615 (24/39)
40	40	1	0	1	1	2	0.872 (34/39)
41	55	1	0	1	1	4	0.667 (26/39)
45	68	1	1	1	1	1	0.605 (23/38)
49	55	1	1	1	0	4	0.622 (23/37)
50	52	1	1	1	1	2	0.615 (24/39)
56	67	1	1	1	0	4	0.615 (24/39)
60	49	1	1	1	0	2	0.744 (29/39)
63	46	1	1	1	0	2	0.667 (26/39)
68	36	1	1	1	1	3	0.538 (21/39)
70	46	1	1	1	0	2	0.718 (28/39)
71	39	1	0	1	0	3	0.538 (21/39)
72	63	1	0	1	1	4	0.595 (22/37)
77	41	1	0	1	0	4	0.553 (21/38)
78	44	1	0	1	1	4	0.667 (26/39)
79	47	1	1	1	1	2	0.538 (21/39)
131	41	1	1	1	1	4	0.590 (23/39)
134	55	1	1	1	1	2	0.718 (28/39)
140	44	1	1	1	0	4	0.538 (21/39)
157	65	1	0	0	0	4	0.605 (23/38)
167	50	1	0	1	1	2	0.543 (19/35)
169	43	1	1	1	1	2	0.658 (25/38)
170	60	1	0	1	0	3	0.641 (25/39)

a. 0: 無抽菸、喝酒或嚼檳榔史; 1: 有抽菸、喝酒或嚼檳榔史

b. 0: 舌癌; 1: 頰膜癌

表 5-2 口腔癌組織微衛星序列標記 LOH 頻率 $\geq 40\%$ 之標記名稱
及其染色體所在位址

標記名稱	LOH (%)	染色體位址	標記名稱	LOH (%)	染色體位址
D10S537	62.5	10q21.3-22.1	D8S260	46.7	8q12-13
D17S799	61.5	17p12-13.1	D13S173	46.7	13q32-34
D14S258	60	14q23-24.3	D2S2211	43.8	2p25
D7S640	58.3	7q31.3	D1S199	42.1	1p35-36.1
D19S216	57.1	19p13.2-13.3	D2S160	42.1	2q12.1
D9S287	54.6	9q22.2	D5S424	42.1	5q13.2
D1S2868	50	1p21.3	D2S325	41.7	2q34
D1S2836	50	1q44	D6S441	41.2	6q24.3
D4S415	50	4q34.1	D9S290	41.2	9q34.1
D6S1581	50	6q25	D14S275	41.2	14q11.2-13
D20S178	47.6	20q12	D5S400	40.9	5q34-35
D2S142	47.1	2q23.2	D4S403	40	4p15.33
D19S210	47.1	19q13.43	D13S217	40	13q12

表 5-3 口腔癌組織染色體區段 LOH 頻率 $\geq 46\%$ 之微衛星序列標記名稱
及可能基因

染色體 區段編號	標記名稱	LOH 頻率 (LOH 個案數/情報個案數)	染色體位址	可能基因
05r4	D5S422			
	D5S400	0.773 (17/22)	5q34-35	
	D5S408			
17r1	D17S849			
	D17S831			
	D17S938	0.741 (20/27)	17p12-13	P53
	D17S799			
	D17S921			
16r3	D16S516	0.625 (10/16)	16q22-24	
	D16S520			
19r1	D19S216	0.619 (13/21)	19p13	XAB2
	D19S226			
02r1	D2S112			
	D2S151	0.607 (17/28)	2q21-24	
	D2S142			
	D2S2330			
04r2	D4S1534			
	D4S414			
	D4S1572	0.593 (16/27)	4q21-28	
	D4S406			
	D4S1575			
14r1	D14S261	0.571 (12/21)	14q11-13	APE1
	D14S275			
10r1	D10S537	0.56 (14/25)	10q21-23	PTEN
	D10S1686			
12r1	D12S99			
	D12S364	0.56 (14/25)	12q24	
	D12S1617			
	D12S345			
13r1	D13S217			
	D13S171	0.552 (16/29)	13q12	BRCA2 Rb
	D13S263			
07r4	D7S486			
	D7S530	0.542 (13/24)	7q31	FRA7G
	D7S640			

表 5-3 口腔癌組織染色體區段 LOH 頻率 $\geq 46\%$ 之微衛星序列標記名稱
及可能基因 (續)

染色體 區段編號	標記名稱	LOH 頻率 (LOH 個案數/情報個案數)	染色體位址	可能基因
05r2	D5S424	0.519 (14/27)	5q13-15	MSH3
	D5S428			
	D5S433			
11r2	D11S898	0.519 (14/27)	11q22-25	H2AX / ATM
	D11S4151			
	D11S1320			
	D11S968			
13r2	D13S170	0.519 (14/27)	13q31-34	LIG4
	D13S173			
	D13S1265			
	D13S285			
08r1	D8S264	0.5 (12/24)	8p23-22	NEIL2
	D8S550			
	D8S549			
08r2	D8S1784	0.5 (6/12)	8q22-24	CCNE2/P53R2
	D8S284			
14r2	D14S63	0.5 (14/28)	14q23-24	RAD51B
	D14S258			
	D14S68			
06r1	D6S308	0.481 (13/27)	6q23-25	
	D6S441			
	D6S1581			
01r3	D1S2878	0.48 (12/25)	1q23	
	D1S196			
	D1S218			
09r3	D9S283	0.478 (11/23)	9q22	XPA
	D9S287			
	D9S1690			
04r1	D4S2935	0.476 (10/21)	4p15-16	
	D4S403			
02r2	D2S325	0.462 (12/26)	2q34-36	Fibronectin(FN)
	D2S2382			
09r5	D9S290	0.458 (11/24)	9q34	
	D9S1826			

表 5-4 舌癌與頰膜癌失去異合性頻率均 $\geq 40\%$ 之微衛星序列標記名稱
及其染色體所在位址

標記名稱	染色體位址	LOH 頻率 (%)	
		頰膜癌 (LOH 個案數/情報個案數)	舌癌 (LOH 個案數/情報個案數)
D1S196	1q23	50 (3/6)	80 (4/5)
D1S2697	1p36.13	50 (1/2)	42.9 (3/7)
D2S2259	2p21	83.3 (5/6)	60 (3/5)
D3S3681	3p12.1	50 (3/6)	66.7 (4/6)
D4S403	4p15.33	50 (2/4)	40 (4/10)
D4S1575	4q27-28	100 (2/2)	100 (2/2)
D4S414	4q21	50 (2/4)	50 (3/6)
D4S415	4q34.1	50 (2/4)	50 (3/6)
D5S416	5p15	83.3 (5/6)	60 (3/5)
D5S422	5q34	40 (2/5)	50 (2/4)
D5S400	5q34-35	40 (4/10)	41.7 (5/12)
D6S441	6q24.3	42.9 (3/7)	40 (4/10)
D7S640	7q31.3	66.7 (4/6)	60 (3/5)
D8S549	8p23.1	50 (1/2)	75 (3/4)
D10S547	10p14	66.7 (2/3)	50 (3/6)
D10S537	10q21.3-22.1	66.7 (6/9)	57.1 (4/7)
D11S1320	11q25	42.9 (3/7)	50 (2/4)
D14S258	14q23-24.3	60 (6/10)	60 (6/10)
D14S261	14q11-12	50 (1/2)	60 (3/5)
D16S404	16p	50 (2/4)	40 (2/5)
D16S520	16q24.2	50 (2/4)	62.5 (5/8)
D17S799	17p12-13.1	57.1 (4/7)	66.7 (4/6)
D17S938	17p13.2	50 (3/6)	42.9 (3/7)
D18S478	18p	57.1 (4/7)	40 (2/5)
D19S216	19p13.2-13.3	71.4 (5/7)	42.9 (3/7)
D19S226	19p13	50 (3/6)	50 (4/8)
D20S178	20q12	50 (5/10)	50 (5/10)
D22S280	22q12.13	50 (2/4)	42.9 (3/7)

表 5-5 微衛星序列標記失去異合性與腫瘤部位之特異性分析

標記名稱	染色體位址	舌癌 (n=14)		頰膜癌 (n=16)		P 值 ^a
		LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	
D3S131I	3q27	3/6 (50)	0/8 (0)	0.05		
D5S2027	5q21	3/4 (75)	3/12 (25)	0.12		
D8S258	8p22	5/8 (62.5)	1/8 (12.5)	0.06		
D12S368	12q13	4/6 (66.7)	1/8 (12.5)	0.06		
D14S985	14q32	3/4 (75)	1/6 (16.7)	0.12		
D1S2878	1q23	1/6 (16.7)	3/4 (75)	0.12		
D1S199	1p35	1/9 (11.1)	5/8 (62.5)	0.04		
D5S424	5q13.2	1/8 (12.5)	7/10 (70)	0.02		
D6S308	6q23	1/6 (16.7)	5/7 (71.4)	0.08		

a : One-tailed P-value by Fisher's exact test

表 5-6 特定微衛星序列標記群失去異合性與腫瘤部位之相關性分析

	舌癌	頰膜癌	P 值 ^a
	LOH 個案數/ 情報個案數(%)	LOH 個案數/ 情報個案數(%)	
Group 1 標記	12/12 (100)	5/15 (33.3)	P=0.0004
Group 2 標記	4/14 (28.6)	13/15 (86.7)	P=0.005

Group 1 標記：包括 D3S1311、D5S2027、D8S258、D12S368 及 D14S985。

Group 2 標記：包括 D1S2878、D1S199、D5S424、D6S308。

LOH 個案：任一情報標記出現 LOH 即屬之。

情報個案：任一標記屬情報標記即屬之。

a : One-tailed P-value by Fisher's exact test

表 5-7 微衛星序列標記失去異合性與腫瘤分期之特異性分析

標記名稱	染色體位址	早期		晚期		P 值 ^a
		LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	
D9S1677	9q31	3/7 (42.9)	0/11 (0)	0.043		
D17S799	17p12	7/8 (87.5)	1/5 (20)	0.032		
D19S418	19q13	4/7 (57.1)	0/8 (0)	0.026		
D6S1581	6q25	0/4 (0)	6/9 (66.7)	0.049		
D17S785	17q25	0/5 (0)	3/3 (100)	0.018		

a : One-tailed P-value by Fisher's exact test

表 5-8 特定微衛星序列標記群失去異合性與腫瘤分期之相關性分析

	早期	晚期	
	LOH 個案數/ 情報個案數(%)	LOH 個案數/ 情報個案數(%)	P 值 ^a
Group 1 標記	0/4(0)	6/9(66.7)	P=0.049
Group 2 標記	2/4 (50)	1/9(11.1)	P=0.2

Group 1 標記：包括 D6S1581 及 D17S785。

Group 2 標記：包括 D9S1677、D17S799 及 D19S418。

LOH 個案：任一情報標記出現 LOH 即屬之。

情報個案：任一標記屬情報標記即屬之。

a：One-tailed P-value by Fisher's exact test

表 5-9 微衛星序列標記失去異合性與酒精暴露之特異性分析

標記名稱	染色體位址	無喝酒史		有喝酒史		P 值 ^a
		LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	LOH 個案數/情報個案數 (%)	
D3S1304	3p26	4/6 (66.7)	0/5 (0)	0.045		0.045
D6S289	6p22	4/8 (50)	1/13 (7.7)	0.047		0.047
D9S167	9q21	3/5 (60)	0/10 (0)	0.026		0.026
D10S1693	10q25	3/6 (50)	0/11 (0)	0.029		0.029
D17S799	17p12	0/3 (0)	8/10 (80)	0.035		0.035
D18S478	18q11	0/4 (0)	6/8 (75)	0.03		0.03

a : One-tailed P-value by Fisher's exact test

表 5-10 特定微衛星序列標記群失去異合性與酒精暴露之相關性分析

	無喝酒史	有喝酒史	P 值 ^a
	LOH 個案數/ 情報個案數(%)	LOH 個案數/ 情報個案數(%)	
Group 1 標記	0/6(0)	11/13(84.6)	P=0.001
Group 2 標記	3/5 (60)	1/11(9.1)	P=0.06

Group 1 標記：包括 D18S478 及 D17S799。

Group 2 標記：包括 D3S1304、D6S289、D9S167 及 D10S169。

LOH 個案：任一情報標記出現 LOH 即屬之。

情報個案：任一標記屬情報標記即屬之。

a : One-tailed P-value by Fisher's exact test

表 5-11 口腔癌組織染色體 MSI 頻率分佈表

個案 編號	年齡 (歲)	抽菸 ^a	喝酒 ^a	嚼檳榔 ^a	腫瘤 ^b 部位	腫瘤 分期	MSI 頻率 (MSI 標記數/ 總分析標記數)
5	58	1	1	1	1	4	0.123 (35/284)
6	56	1	1	1	1	1	0.126 (32/254)
21	39	1	1	1	0	4	0.400 (91/227)
24	44	1	1	1	0	1	0.275 (71/258)
28	54	1	1	1	1	4	0.631 (128/203)
30	46	1	0	1	1	4	0.281 (79/281)
34	45	0	1	1	0	4	0.244 (60/246)
35	38	0	1	1	0	2	0.283 (65/230)
40	40	1	0	1	1	2	0.439 (104/237)
41	55	1	0	1	1	4	0.496 (114/230)
45	68	1	1	1	1	1	0.524 (110/210)
49	55	1	1	1	0	4	0.567 (161/284)
50	52	1	1	1	1	2	0.254 (73/287)
56	67	1	1	1	0	4	0.472 (117/248)
60	49	1	1	1	0	2	0.170 (53/312)
63	46	1	1	1	0	2	0.627 (175/279)
68	36	1	1	1	1	3	0.619 (182/294)
70	46	1	1	1	0	2	0.399 (115/288)
71	39	1	0	1	0	3	0.211 (62/294)
72	63	1	0	1	1	4	0.398 (121/304)
77	41	1	0	1	0	4	0.214 (55/257)
78	44	1	0	1	1	4	0.187 (53/284)
79	47	1	1	1	1	2	0.423 (77/182)
131	41	1	1	1	1	4	0.402 (96/239)
134	55	1	1	1	1	2	0.531 (112/211)
140	44	1	1	1	0	4	0.581 (97/167)
157	65	1	0	0	0	4	0.505 (94/186)
167	50	1	0	1	1	2	0.543 (76/140)
169	43	1	1	1	1	2	0.467 (105/225)
170	60	1	0	1	0	3	0.398 (97/244)

a. 0：無抽菸、喝酒或嚼檳榔史；1：有抽菸、喝酒或嚼檳榔史

b. 0：舌癌；1：頰膜癌

表 5-12 台灣地區口腔癌常見微衛星序列不穩定之標記名稱
及其染色體所在位址

標記名稱	MIN 頻率 (%)	染色體位置
D3S1580	95.45 (21/22)	3q27
D19S220	80 (16/20)	19q13
D1S450	75 (15/20)	1p36
D2S367	75 (15/20)	2p21
D22S315	73.1 (19/26)	22q12.33
D1S2800	69.2 (18/26)	1q42.3
D6S422	66.7 (14/21)	6p22.2
D5S419	66.7 (14/21)	5p13.2
D6S460	66.7 (13/20)	6q12
D2S335	65 (15/24)	2q24
D19S902	62.5 (13/22)	19q13.3
D1S413	61.9 (13/22)	1q31-32.1
D2S337	61.9 (14/24)	2p15
D9S171	60 (14/24)	9p21
D15S127	60 (15/26)	15q26.1

表 5-13 微衛星序列不穩定與腫瘤部位之特异性分析

標記名稱	染色體位址	舌癌 (n=14)		頰膜癌 (n=16)		P 值 ^a
		微衛星序列不穩定個案 /分析個案數 (%)	微衛星序列不穩定個案 /分析個案數 (%)			
D5S424	5q13	4/12 (33.3)	0/16 (0)	0.02		
D11S925	11q23	9/10 (90)	2/6 (33.3)	0.04		
D1S452	1q21-23	1/8 (12.5)	7/8 (87.5)	0.005		
D3S1289	3p21	2/9 (22.2)	9/12 (75)	0.02		
D6S422	6p22	5/11 (45.5)	9/10 (90)	0.04		
D7S507	7p15	0/11 (0)	9/11 (81.8)	0.02		
D9S171	9p21	2/8 (25)	5/8 (62.5)	0.02		
D20S115	20p12	1/10 (10)	7/10 (70)	0.02		

a : One-tailed P-value by Fisher's exact test

参考文献

- Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, *260*, 812-816.
- Achille, A., Biasi, M. O., Zamboni, G., Bogina, G., Magalini, A. R., Pederzoli, P., et al. (1996). Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.*, *56*, 3808-3813.
- Adachi, J., Shiseki, M., Okazaki, T., Ishimaru, G., Noguchi, M., Hirohashi, S., et al. (1995). Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.*, *14*, 301-306.
- Adamson, R., Jones, A. S., & Field, J. K. (1994). Loss of heterozygosity studies on chromosome 17 in head and neck cancer using microsatellite markers. *Oncogene*, *9*, 2077-2082.
- Ah-See, K. W., Cooke, T. G., Pickford, I. R., Soutar, D., & Balmain, A. (1994). An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res.*, *54*, 1617-1621.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, *53*, 549-554.
- Beder, L. B., Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Gunduz, E., Ito, S., et al. (2003). Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. *Lab. Invest.*, *83*, 99-105.
- Benjamin, M. B., Potter, H., Yandell, D. W., & Little, J. B. (1991). A system for assaying homologous recombination at the endogenous human thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *88*, 6652-6656.
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D.,

- Eshleman, J. R., Burt, R. W., et al. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, *58*, 5248-5257.
- Bonner, R. F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., et al. (1997). Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, *278*, 1481,1483.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., et al. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.*, *56*, 2488-2492.
- Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., et al. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, *305*, 779-784.
- Chang, K. W., Lin, S. C., Mangold, K. A., Jean, M. S., Yuan, T. C., Lin, S. N., et al. (2000). Alterations of adenomatous polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, *29*, 223-226.
- Chen, Q., Samaranayake, L. P., Zhou, H., & Xiao, L. (2000). Homozygous deletion of the PTEN tumor-suppressor gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, *36*, 95-99.
- Cookson, W. O., Ubhi, B., Lawrence, R., Abecasis, G. R., Walley, A. J., Cox, H. E., et al. (2001). Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat.Genet.*, *27*, 372-373.
- Cowan, J. M., Beckett, M. A., Ahmed-Swan, S., & Weichselbaum, R. R. (1992). Cytogenetic evidence of the multistep origin of head and neck squamous cell carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, *84*, 793-797.
- De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C., &

- Jirtle, R. L. (1995). M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat. Genet.*, *11*, 447-449.
- Dunn, J. M., Phillips, R. A., Becker, A. J., & Gallie, B. L. (1988). Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science*, *241*, 1797-1800.
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., et al. (1996). Laser capture microdissection. *Science*, *274*, 998-1001.
- Endow, S. A., Polan, M. L., & Gall, J. G. (1975). Satellite DNA sequences of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, *96*, 665-692.
- Erber, R., Klein, W., Andl, T., Enders, C., Born, A. I., Conradt, C., et al. (1997). Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int. J. Cancer*, *74*, 383-389.
- Field, J. K., Kiaris, H., Risk, J. M., Tsiriyotis, C., Adamson, R., Zoumpourlis, V., et al. (1995). Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br. J. Cancer*, *72*, 1180-1188.
- Girard, L., Zochbauer-Muller, S., Virmani, A. K., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (2000). Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res.*, *60*, 4894-4906.
- Godwin, A. R., Bollag, R. J., Christie, D. M., & Liskay, R. M. (1994). Spontaneous and restriction enzyme-induced chromosomal recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *91*, 12554-12558.
- Gonzalez, M. V., Pello, M. F., Lopez-Larrea, C., Suarez, C., Menendez, M. J., & Coto, E. (1997). Deletion and methylation of the tumour

- suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, *50*, 509-512.
- Grati, F. R., Sirchia, S. M., Garagiola, I., Sironi, E., Galioto, S., Rossella, F., et al. (2000). Losses of heterozygosity in oral and oropharyngeal epithelial carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, *118*, 57-61.
- Gupta, P. C., Pindborg, J. J., & Mehta, F. S. (1982). Comparison of carcinogenicity of betel quid with and without tobacco: an epidemiological review. *Ecol. Dis.*, *1*, 213-219.
- Hankins, G. R., De Souza, A. T., Bentley, R. C., Patel, M. R., Marks, J. R., Iglehart, J. D., et al. (2003). M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene*, *12*, 2003-2009.
- Huang, J. S., Chiang, C. P., Kok, S. H., Kuo, Y. S., & Kuo, M. Y. (1997). Loss of heterozygosity of APC and MCC genes in oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J. Oral Pathol. & Med.*, *26*, 322-326.
- IARC. (1986). Betel-quid and areca-nut chewing. In (Vol. 37, pp. 141-291): International Agency for Research on Cancer, Lyon, Monographs.
- Ibrahim, S. O., Vasstrand, E. N., Johannessen, A. C., Idris, A. M., Magnusson, B., Nilsen, R., et al. (1999). Mutations of the p53 gene in oral squamous-cell carcinomas from Sudanese dippers of nitrosamine-rich toombak and non-snuff-dippers from the Sudan and Scandinavia. *Int. J. Cancer*, *81*, 527-534.
- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., & Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, *363*, 558-561.
- Ishii, H., Baffa, R., Numata, S. I., Murakumo, Y., Rattan, S., Inoue, H., et al. (1999). The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple

- human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 3928-3933.
- Ishii, H., Vecchione, A., Murakumo, Y., Baldassarre, G., Numata, S., Trapasso, F., et al. (2001). FEZ1/LZTS1 gene at 8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 10374-10379.
- Ishwad, C. S., Ferrell, R. E., Rossie, K. M., Appel, B. N., Johnson, J. T., Myers, E. N., et al. (1995). Microsatellite instability in oral cancer. *Int. J. Cancer*, 64, 332-335.
- Jamieson, T. A., Brizel, D. M., Killian, J. K., Oka, Y., Jang, H. S., Fu, X., et al. (2003). M6P/IGF2R loss of heterozygosity in head and neck cancer associated with poor patient prognosis. *BMC Cancer*, 3, 13.
- Jones, J. W., Raval, J. R., Beals, T. F., Worsham, M. J., Van Dyke, D. L., Esclamado, R. M., et al. (1997). Frequent loss of heterozygosity on chromosome arm 18q in squamous cell carcinomas. Identification of 2 regions of loss--18q11.1-q12.3 and 18q21.1-q23. *Arch. Otolaryngol. Head neck Surg.*, 123, 610-614.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 68, 820-823.
- Ko, Y. C., Huang, Y. L., Lee, C. H., Chen, M. J., Lin, L. M., & Tsai, C. C. (1995). Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J. Oral Pathol. & Med.*, 24, 450-453.
- Kok, S. H., Lee, J. J., Hsu, H. C., Chiang, C. P., Kuo, Y. S., & Kuo, M. Y. (2002). Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in areca quid and tobacco-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J. Oral Pathol. & Med.*, 31, 395-401.
- Kong, F. M., Anscher, M. S., Washington, M. K., Killian, J. K., & Jirtle, R. L. (2000). M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung. *Oncogene*, 19, 1572-1578.

- Lasko, D., Cavenee, W., & Nordenskjold, M. (1991). Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu. Rev. Genet.*, 25, 281-314.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-649.
- Lin, J. T., Wu, M. S., Shun, C. T., Lee, W. J., Wang, J. T., Wang, T. H., et al. (1995). Microsatellite instability in gastric carcinoma with special references to histopathology and cancer stages. *Eur. J. Cancer*, 11, 1879-1882.
- Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B., & Nordenskjold, M. (1993). Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat. Genet.*, 5, 279-282.
- Maestro, R., Gasparotto, D., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulfaro, S., & Boiocchi, M. (1993). Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res.*, 53, 5775-5779.
- Mahale, A., & Saranath, D. (2000). Microsatellite alterations on chromosome 9 in chewing tobacco-induced oral squamous cell carcinomas from India. *Oral Oncology*, 36, 199-206.
- Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Heller, W. D., & Weidauer, H. (1992). Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin. Invest.*, 70, 320-327.
- Mao, E. J., Schwartz, S. M., Daling, J. R., & Beckmann, A. M. (1998). Loss of heterozygosity at 5q21-22 (adenomatous polyposis coli gene region) in oral squamous cell carcinoma is common and correlated with advanced disease. *J. Oral Pathol. & Med.*, 27, 297-302.
- Miyakawa, A., Wang, X. L., Nakanishi, H., Imai, F. L., Shiiba, M., Miya, T., et al. (1998). Allelic loss on chromosome 22 in oral cancer: possibility of the existence of a tumor suppressor gene on 22q13. *Int.*

J. Oncol. , 13, 705-709.

Muir, C., & Weiland, L. (1995). Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer*, 75(1 Suppl), 147-153.

Nawroz, H., van der Riet, P., Hruban, R. H., Koch, W., Ruppert, J. M., & Sidransky, D. (1994). Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 54, 1152-1155.

Ng, I. O., Xiao, L., Lam, K. Y., Yuen, P. W., & Ng, M. (2000). Microsatellite alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck - clustering of loss of heterozygosity in a distinct subset. *Oral Oncology*, 36, 484-490.

Nowell, P. C. (1997). Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 94, 13-19.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., et al. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278, 7743-7746.

Pande, P., Mathur, M., Shukla, N. K., & Ralhan, R. (1998). pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncology*, 34, 396-403.

Parkin, D., Whelan, S., & Ferlay, J. (1997). *Cancer Incidence in Five Continents, Volume VII*.

Parkin, D. M., Pisani, P., & Ferlay, J. (1993). Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*, 54, 594-606.

Partridge, M., Kiguwa, S., & Langdon, J. D. (1994). Frequent deletion of chromosome 3p in oral squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer. Part B, Oral Oncology*. 30B, 4, 248-251.

- Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., et al. (1998). Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J. Clin. Oncol.*, *16*, 2659-2671.
- Pershouse, M. A., El-Naggar, A. K., Hurr, K., Lin, H., Yung, W. K., & Steck, P. A. (1997). Deletion mapping of chromosome 4 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, *14*, 369-373.
- Regezi, J. A., Zarbo, R. J., Regev, E., Pisanty, S., Silverman, S., & Gazit, D. (1995). p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. *J. Oral Pathol. & Med.*, *24*, 18-22.
- Rosell, R., Pifarre, A., Monzo, M., Astudillo, J., Lopez-Cabrerizo, M. P., Calvo, R., et al. (1997). Reduced survival in patients with stage-I non-small-cell lung cancer associated with DNA-replication errors. *Int. J. Cancer*, *74*, 330-334.
- Rowley, H., Jones, A. S., & Field, J. K. (1995). Chromosome 18: a possible site for a tumour suppressor gene deletion in squamous cell carcinoma of the head and neck.. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, *20*, 266-271.
- Schar, P. (2001). Spontaneous DNA damage, genome instability, and cancer—when DNA replication escapes control. *Cell*, *104*, 329-332.
- Scully, C., Field, J. K., & Tanzawa, H. (2000a). Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncoogyl*, *36*, 311-327.
- Scully, C., Field, J. K., & Tanzawa, H. (2000b). Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology*, *36*, 256-263.

- Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., et al. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.*, *313*, 1111-1116.
- Sengelov, L., Christensen, M., von der Maase, H. D., Horn, T., Marcussen, N., Kamby, C., et al. (2000). Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome. *Cancer Genet. Cytogenet.*, *123*, 109-113.
- Shao, J. Y., Wang, H. Y., Huang, X. M., Feng, Q. S., Huang, P., Feng, B. J., et al. (2000). Genome-wide allelotype analysis of sporadic primary nasopharyngeal carcinoma from southern China. *Int. J. Oncology*, *17*, 1267-1275.
- Shen, C. Y., Yu, J. C., Lo, Y. L., Kuo, C. H., Yue, C. T., Jou, Y. S., et al. (2000). Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.*, *60*, 3884-3892.
- Sheu, J. C., Lin, Y. W., Chou, H. C., Huang, G. T., Lee, H. S., Lin, Y. H., et al. (1999). Loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Br. J. Cancer*, *80*, 468-476.
- Simoneau, A. R., Spruck, C. H., 3rd, Gonzalez-Zulueta, M., Gonzalgo, M. L., Chan, M. F., Tsai, Y. C., et al. (1996). Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res.*, *56*, 5039-5043.
- Simpson, D. J., Bicknell, E. J., Buch, H. N., Cutty, S. J., Clayton, R. N., & Farrell, W. E. (2003). Genome-wide amplification and allelotyping of sporadic pituitary adenomas identify novel regions of genetic loss. *Genes Chromosomes Cancer*, *37*, 225-236.

- Thibodeau, S. N., Bren, G., & Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, *260*, 816-819.
- Thomas, S., Brennan, J., Martel, G., Frazer, I., Montesano, R., Sidransky, D., et al. (1994). Mutations in the conserved regions of p53 are infrequent in betel-associated oral cancers from Papua New Guinea. *Cancer Res.*, *54*, 3588-3593.
- Uzawa, N., Yoshida, M. A., Hosoe, S., Oshimura, M., Amagasa, T., & Ikeuchi, T. (1998). Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.*, *107*, 125-131.
- Van der Riet, P., Nawroz, H., Hruban, R. H., Corio, R., Tokino, K., Koch, W., et al. (1994). Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res.*, *54*, 1156-1158.
- Virgilio, L., Shuster, M., Gollin, S. M., Veronese, M. L., Ohta, M., Huebner, K., et al. (1996). FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *93*, 9770-9775.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y., et al. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, *244*, 207-211.
- Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M., & Hong, W. K. (1993). Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.*, *328*, 184-194.
- Voravud, N., Shin, D. M., Ro, J. Y., Lee, J. S., Hong, W. K., & Hittelman, W. N. (1993). Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Res.*, *53*, 2874-2883.
- Wang, S. I., Puc, J., Li, J., Bruce, J. N., Cairns, P., Sidransky, D., et al. (1997). Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme.

Cancer Res., 57, 4183-4186.

Wang, X. L., Uzawa, K., Miyakawa, A., Shiiba, M., Watanabe, T., Sato, T., et al. (1998). Localization of a tumour-suppressor gene associated with human oral cancer on 7q31.1. *Int. J. Cancer*, 75, 671-674.

Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, 49, 3713-3721.

Wistuba, II, Tang, M., Maitra, A., Alvarez, H., Troncoso, P., Pimentel, F., et al. (2001). Genome-wide allelotyping analysis reveals multiple sites of allelic loss in gallbladder carcinoma. *Cancer Res.*, 61, 3795-3800.

Wu, C. L., Roz, L., Sloan, P., Read, A. P., Holland, S., Porter, S., et al. (1997). Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 20, 347-353.

Yee, C. J., Roodi, N., Verrier, C. S., & Parl, F. F. (1994). Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res.*, 54, 1641-1644.

Yoo, G. H., Xu, H. J., Brennan, J. A., Westra, W., Hruban, R. H., Koch, W., et al. (1994). Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 54, 4603-4606.

Zenklusen, J. C., Bieche, I., Lidereau, R., & Conti, C. J. (1994). (C-A)_n microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 12155-12158.

Zenklusen, J. C., Thompson, J. C., Klein-Szanto, A. J., & Conti, C. J. (1995). Frequent loss of heterozygosity in human primary

squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res.*, 55, 1347-1350.

Zenklusen, J. C., Thompson, J. C., Troncoso, P., Kagan, J., & Conti, C. J. (1994). Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1. *Cancer Res.*, 54, 6370-6373.

Zenklusen, J. C., Weitzel, J. N., Ball, H. G., & Conti, C. J. (1995). Allelic loss at 7q31.1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene. *Oncogene*, 11, 359-363.

Zhuang, Z., Park, W. S., Pack, S., Schmidt, L., Vortmeyer, A. O., Pak, E., et al. (1998). Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.*, 20, 66-69.

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本，92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院) 毒理學 系所
組 九十一 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。
論文名稱：台灣地區口腔鱗狀上皮細胞癌基因體不穩定特徵

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：李輝
謝玲玲

研究生簽名：簡暉慈
(親筆正楷)

學號：9015001
(務必填寫)

日期：民國 92 年 8 月 7 日