

國立臺灣大學醫學院  
臨床醫學研究所

博士論文

鼻咽癌的基因異常

Genetic Aberrations in  
Nasopharyngeal Carcinoma

指導教授：徐茂銘  
陳培哲

研究生：柯政郁

中華民國九十年十二月

## 致 謝

歲月如梭，歷經兩頂尖雜誌的退稿，一再修正之後，原本綽綽有餘的博士班學程，只剩下休學最後的緊迫期。有別於同班同學在升任主治醫師之後，便修習臨床醫學研究所博士班課程，我則居於時空的限制，科內無法同時提供多名主治醫師在職進修的情況下，只好專注於臨床工作。五年下來，雖然當不成 Batman，但至少是位像樣的 man，而不是一隻 bat。等到同班同學博士班畢業，取得博士、副教授學位後，我才得於第六年主治醫師時，就讀博士班，剛好遇上博士班課程改革，必修不少大堂上課的基礎科目，以 36 歲老大年齡和年輕小夥子，一起受教於曾是高中同學的醫學院老師門下。雖然唸得很辛苦，考試成績逐漸下滑，總算打下一些分子與細胞生物學、訊息傳遞等基礎，內心比較踏實，比較有信心與基礎研究學者對話，雖然較晚才唸博士班，可是剛好趕上尖端基因醫學的浪潮，有幸在陳培哲教授的指導之下，受教於剛回國、任職於國家衛生研究院的周玉山博士，研習高科技，高效率的基因醫學。回想頭兩年，除了臨床工作之外，又要唸很多基礎課程，到晚上常會邊看書、邊打瞌睡，等到第三年開始有時間作實驗，回憶為了淬取 DNA，雙手常因研磨癌症組織而腫痛，往往必須利用晚上或假日加班，幸好家人的諒解與支持，總算一路熬過來。等到投稿階段，又得承受退稿、修改、等待與時間緊迫的壓力，如果不是心理太健康，恐怕早就得精神病了。還好皇天不負苦心人，終於在周博士的鼎力相助之下，於第九年獲得 *Cancer* 雜誌的青睞，而使一顆忐忑不安的心穩定下來。

回想自民國 64 年考上臺大醫學系以後，一直在臺大醫學體系下接受薰陶，總算到 91 年可以從臨床醫學研究所博士班畢業，除了感謝養我、育我的父母之外，首先要謝謝啟蒙的林月裏老師、吳欽仰老師和陳世榮老師，以至後來助我考上臺大醫學系的建中吳英蜀老師、洪玉川老師，收我為入門弟子的謝地教授，授我一身技藝，並提拔我任主治醫師的徐茂銘教授，指導基礎醫學的陳培哲教授、周玉山博士，還有國科會、耳鼻喉科的全體同仁、趙娟娟碩士、林佳樺小姐，以及伴我一起成長、存活的所有病人。接著最要感謝的是，我的愛妻及幫我照顧一對貼心兒女的岳父母，謝謝他們的支持與鼓勵。最後我願將這一切榮耀歸於最近仙逝的爸爸，願他在天之靈得以寬慰、安心！

柯政郁 謹識 2002 年

# 目 錄

1. 中文摘要-----	1
2. 緒論-----	4
一 鼻咽癌的流行病學-----	5
二 鼻咽癌的危險因子-----	6
三 鼻咽癌的診斷-----	8
四 鼻咽癌的分類與治療-----	10
五 鼻咽癌的基因學-----	14
3. 研究方法與材料-----	18
第一部份: Bleomycin 試驗-----	19
第二部份: 比較型基因組雜交法-----	20
第三部份: 失異合性-----	21
4. 結果-----	22
第一部份: Bleomycin 試驗-----	23
第二部份: 比較型基因組雜交法-----	24
第三部份: 失異合性-----	25
5. 討論-----	26
6. 展望-----	39
7. 論文英文簡述-----	44
8. 參考文獻-----	54
9. 附錄-----	70

# 中文摘要

台灣人的鼻咽癌和抽菸、喝酒沒顯著關係，大多數病人有較高的抗 EB 病毒血清力價，另外在臨床上發現鼻咽癌和其他頭頸部癌如口腔、口咽、喉及下咽癌的生物特性不一樣，如鼻咽癌對放射線或抗癌藥物敏感，比較容易遠隔轉移等，因此治療以放射和化學治療為主；其他頭頸部癌，尤其口腔癌則和抽菸、喝酒、嚼檳榔有顯著關係，對放射線較不敏感，治療以手術配合術後放射線治療為主，但是有上述三種習性者也只有少數出現頭頸部癌，因此對外來基因毒害劑的感受性，被認為在致癌過程中佔有一個重要的角色。在一般族群中，存在著不同程度的修補 DNA 之能力，以 bleomycin 來測試對誘變劑的感受性，可作為對癌症感受性及出現第二個原發腫瘤的一種生物標記。

癌症的發生是多重因素的，不管是遺傳、致癌物質或病毒，都是在基因組的某些部位發生病變，導致一連串致癌基因的活化及抑癌基因的去活化，偵測這兩種基因變化最直接的方法，便是看看基因有無增幅或缺失。比較型基因組雜交法 (comparative genomic hybridization) 在一次實驗，可得知一個癌症所有染色體基因的增減情形。本研究的目的是，為了明瞭鼻咽癌所有染色體基因的增減情形，有助於進一步深入研究與鼻咽癌相關的致癌基因及抑癌基因。

抑癌基因的去活化是癌細胞形成最常見的現象，若癌細胞有失異合性 (LOH) 的情形，可推測或找到該缺失段可能有抑癌基因。過去的報告指出鼻咽癌在第 3, 9, 11, 13, 14 對染色體有 LOH，尤其 9p21-22 有純合性缺失 (homozygous deletion)。為了進一步發現在第 3、9、11 對染色體上更小區段的 LOH，找出導致鼻咽癌的抑癌基因，以及看 *FHIT* 及 *p16* 基因在鼻咽癌細胞有無突變，而有本研究。

蒐集國立台灣大學醫學院附設醫院耳鼻喉部鼻咽癌 (NPC)、口腔或口咽癌 (ORC)、喉或下咽癌 (LHC) 及非癌症的病人各 35 名。以作用類似放射線之 bleomycin，引起週邊血液淋巴球染色單體斷裂的方法，比較鼻咽癌和非癌症病人及其他頭頸部癌病人的平均染色單體斷裂數 (breaks/cell, b/c)。結果發現非癌症、鼻咽癌、口腔口咽癌、及喉下咽癌者的平均染色單體斷裂數分別是  $0.80 \pm 0.32$ ,  $1.03 \pm 0.45$ ,  $1.30 \pm 0.44$ , 和  $1.35 \pm 0.46$ ，所有癌症病人比非癌症病人有顯著高的 b/c，鼻咽癌病人比口腔口咽癌及喉下咽癌者有顯著低的 b/c，顯示鼻咽癌病人比口腔口咽癌及喉下咽癌者有較低的誘變劑感受性，此結果和臨床及流行病學發現鼻咽癌和其他頭頸部癌之特性有所不同相類似。環境致癌因子在鼻咽癌的致病過程，可能扮演一個較不顯著的角色。

為了進一步瞭解鼻咽癌的基因變化，吾人蒐集 25 名鼻咽癌病人，於作切片檢查時，取其鼻咽癌組織，以及住院接受手術的 26 名復發的鼻咽癌病人，取其復發的鼻咽癌組織。同時抽取其周邊血液，分別萃取癌細胞及正常淋巴球之 DNA，以比較型基因組雜交法 (CGH) 分析鼻咽癌所有染色體基因的增減情形，結果發現基因增加出現於染色體 12p(59%)，1q(47%)，17q(47%)，近中央節的 11q(41%)，12q(35%)，9q(24%) 及 8(24%)；基因缺失的有染色體 3p(53%)，9p(41%)，13q(41%)，14q(35%)，靠遠端的 11q(29%)，5q(25%) 及 16q(19%) (Chen, 1999)。顯示位於這些染色體相關的致癌基因及抑癌基因，可能在鼻咽癌的致病過程當中，扮演重要的角色。

LOH 可以比用 CGH 發現更小區段的染色體缺失，吾人蒐集國立台灣大學醫學院附設醫院耳鼻喉部門診部 30 名鼻咽癌病人，於作切片檢查時，取其鼻咽癌組織，以及住院接受手術的 18 名復發的鼻咽癌病人 (13 名位於鼻咽，5 名位於頸部)，取其復發的鼻咽癌組織。同時抽取其周邊血液，分別萃取癌細胞及正常淋巴球之 DNA，另外取得三個細胞株：HONE-1, CNE-1, CNE-2，然後萃取其 DNA 及 RNA，

以位於第 3, 9, 11 對染色體上特定位置的 133 個附有螢光物質的微衛星多形標記引子, 分析鼻咽癌的失異合性, 結果有 70% (34/48) 出現片段的等位基因缺失 (fractional allelic loss, FAL), FAL 在每個染色體臂的頻率是 3p: 96% (46/48), 3q: 85% (41/48), 9p: 42% (20/48), 9q: 71% (34/48), 11p: 38% (18/48), 11q: 92% (44/48), 染色體 3、9、11 上所有標記的等位基因缺失之頻率分別是 24%, 20% 及 21%, 這些結果顯示常見的缺失段位於以前報告過的 3p14-21 (再縮小為 3p24.3-21.31 及 3p14.3-13), 9p21-23, 11q13-21 (可再縮小到 11q14.3) 和 11q21-23 (可再縮小到 11q22.1-23.2), 此外有八個新發現常見的缺失段位於 3p25.2-25.1, 3q22.1-23, 3q26.2-27.1, 3q29, 9q21.32-22.2, 9q34.12-34.3, 11p15.5-15.4 及 11q24.3-25, 除了 3q27-qter 以外, 每一個 LOH 區段也出現在很多家族性及散在性癌症, 而且每一個 LOH 區段都包括有抑癌基因, 顯示這些抑癌基因可能參與鼻咽癌的形成。最後經過比對分析, 可定出三段最小重疊的 LOH 區域: 3p25.3-24.1 (D3S2403-D3S4535, < 19 cM)、3p23-21.31 (D3S1768-D3S1766, < 9 cM) 及 11q22.1-23.2 (D11S2000-D11S965, < 8 cM), 而且發生 LOH 的比率分別高達 75% (36/48), 65% (31/48), 67% (32/48)。標記 D9S318、D11S1304 分別所在的 9q21.3-22.21、1q24.3-25 之等位基因缺失和 N2/N3 有顯著相關性 ( $p=0.035$ 、 $p=0.005$ ); 標記 D9S905、D11S1304 分別所在的 9q34.1-34.3、11q24.3-25 之等位基因缺失和晚期的鼻咽癌有顯著相關性 ( $p=0.022$ 、 $p=0.017$ )。

為了分析參與鼻咽癌致病過程的已知抑癌基因, 吾人選擇位於 3p14.3-13 的 *FHIT* 及位於 9p22.1-13.3 的 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 進行突變篩選, 雖然 *FHIT* 所在的 3p14.3-13 之等位基因缺失和早期的鼻咽癌有顯著相關性, 但是從 21 個鼻咽癌組織的 *FHIT*、*p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 之轉錄區, 並沒有發生突變。然而, 在三個細胞株中, 可在 HONE-1 的 *FHIT* 發現兩個點突變: Ser77Pro 及 Gln90Arg; CNE-1 的 *FHIT* 發現一個點突變。至於從 *INK4a/ARF* 轉錄出的 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>*, 則在三個細胞株都可發現於 intron 1 和 exon 2 交接處, 出現 A→C 的點突變, 後來經 RT-PCR 及序列分析, 發現有捨接失誤, 漏掉 exon 2, 出現較短的 mRNA, 顯示 *FHIT*, *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 在鼻咽癌的形成過程中是佔有關鍵地位的。

緒

論

## 一 鼻咽癌的流行病學

鼻咽癌很少發生於歐美國家的白人，非洲裔黑人也很少，即使亞洲的日本人、韓國人一樣很少見。根據美國 1973-1986 年的統計，白人每年每十萬人口罹患鼻咽癌的人數，男性 0.53 人，女性 0.2 人；日本每年每十萬人口罹患鼻咽癌的人數約 0.27 人(Burt, 1992)。但鼻咽癌卻是中國大陸東南沿海各省及台灣非常普遍性的一種上皮癌症，從幾歲大到八十幾歲都可能罹患，其中以四十五歲上下的人罹患率最高，正值人生最輝煌燦爛的壯年期，其對國家社會及家庭傷害之大可想而知。中國人當中，尤其是廣東省籍，罹患率最高，因此有人將鼻咽癌又稱為「廣東瘤」，即使是移居海外的中國人之後裔，發生鼻咽癌的機率，仍是遠高於當地人(Yeh, 1954; Editorial, 1976; Hirayama, 1978; Hildesheim, 1993; Huang, 1999)。

根據世界衛生組織的報告，散居世界五大洲之華人罹患鼻咽癌的比率，在男性每十萬人口 6-33 名，女性每十萬人口 2-14 名，依比率之高低順序為香港、新加坡、舊金山、台北、洛杉磯、夏威夷、上海。廣東人越多的地方，比率越高，男女之比大約為 2-3 比 1(IARC, 1976)。新加坡的福建籍居民每年每十萬人口發生鼻咽癌者，在男性為 14.1 人，女性為 4.7 人；祖籍潮州者，男性為 18.3 人，女性為 6.2 人；廣東省籍者，男性為 29.1 人，女性為 11.0 人；祖籍客家者，男性為 12.6 人，女性為 4.8 人(Chiang, 1973)。香港 1984 年每十萬人口發生鼻咽癌者，在男性為 27.3 人，女性為 10.6 人(Hong Kong DMHS, 1984-1985)。民國八十六年台灣共有 29,011 人死於惡性腫瘤，佔所有死亡人數的 24.30%，每十萬人口粗死亡率為 134.10，每十萬人口年齡標準化死亡率為 126.71。同年被新診斷為癌症的人數共有 46,612 人，每十萬人口粗發生率為 215.46，每十萬人口年齡標準化發生率為 202.79。同年，鼻咽惡性腫瘤發生個案數佔全部惡性腫瘤發生個案數的 2.72%，鼻咽惡性腫瘤死亡人數佔全部惡性腫瘤死亡人數的 3.01%。發生率的排名於男性為第八位、女性為第十三位；死亡率的排名於男性為第七位、女性為第十一位。民國八十六年初次診斷為鼻咽惡性腫瘤者共計 1,270 人，其中男性 932 人，女性 338 人，男女別 2.67:1，年齡中位數皆為 48.0 歲，每十萬人口粗發生率分別為 8.39、3.21，每十萬人口年齡標準化發生率分別為 7.90、2.96。民國八十六年死因為鼻咽惡性腫瘤者共計 874 人，其中男性 654 人，女性 220 人，男女別 2.85:1，年齡中位數分別為 55.0、56.0 歲，每十萬人口粗死亡率分別為 5.88、2.09，每十萬人口年齡標準化死亡率分別為 5.73、2.01。就是因為這種地區及種族上的極端差異，引起醫學界極大的興趣，希望藉助流行病學的調查、統計及分析，加上實驗室的各種血清免疫、遺傳學的檢查，尋找出華人易患鼻咽癌之原因。



## 二 鼻咽癌的危險因子

### 1. EB 病毒感染：

鼻咽癌病人血清當中，對抗 EB 病毒有關抗原的抗體力價比正常人、或其他頭頸部癌症病人高出很多(Hsu, 1974; Pearson, 1983)。EB 病毒的抗體力價隨著不同檢驗試劑，有不同的標準，以臺大醫院的檢驗室為例，在台灣的鼻咽癌病人，有 70% 其 anti-VCA IgA 的力價高於 1:10，但是正常人也有 14% 高於 1:10，另外 anti-VCA IgG 較不準確，其力價往往高於 1:640，即使正常人的力價也是很高(Hsu, 1992)，主要是因為小時候幾乎每個人都感染過 EB 病毒，所以血液中驗出 EB 病毒的抗體，是件很稀鬆平常的事情，並不等於罹患鼻咽癌。即使幾乎所有的鼻咽癌細胞都存在有 EB 病毒，到目前為止，仍無法證明 EB 病毒直接引起鼻咽癌，倒是有人認為它是無辜的路過者，因它而使腫瘤加速生長(Lin, 2000)。

### 2. 遺傳因子：

鼻咽癌病人常伴隨有特殊，會遺傳的白血球抗原系統(Simon, 1974a, 1974b; Chan, 1983; Wu, 1989; Hammon, 1990; Lu, 1990)。另外新加坡得鼻咽癌的華人，其體內控制兩種紅血球酵素: transferrin 及 6-phosphogluconate dehydrogenase 的遺傳基因與常人有別(Kirk, 1978)。此外在同一家族常發現有很多人得鼻咽癌(Ho, 1972, Lanier, 1979; Gajwani, 1980; Coffin, 1991; Albeck, 1993)，也有孿生兄弟都得鼻咽癌(Linne, 1980; Nevo, 1971);也有鼻咽癌病人的九個子女當中的五個亦是鼻咽癌患者，即使彼此已不再同住一起(Ko, 1998b)。如果一等親當中有人得鼻咽癌，根據統計其罹患鼻咽癌的危險性是常人的 19.2 倍(Chen, 1990)。倒是很少看到夫妻檔都得鼻咽癌，這些現象支持鼻咽癌可能與遺傳有關，而與傳染無關。有人報告可從人體分離出一種基因(cytochrome p450)，該基因負責亞硝基胺的代謝，使其變成更強的致癌物(Song, 1986)，而在兔子的實驗，此種基因所主導的產物，可出現於鼻咽的上皮(Ding, 1986)。推測高危險群，易得鼻咽癌者，可能其主導代謝亞硝基胺的基因發生構造上的異常，使得代謝酵素的表現也有問題，因而導致鼻咽癌。過去的研究發現從小就吃含亞硝酸鹽較多的醃漬品，比較容易罹患鼻咽癌，而體內肝臟及鼻腔表皮細胞的 cytochrome p450，可以將其活化，在已知的 250 種 cytochrome p450 (CYP) 酵素中，特別是 CYP2E1 對亞硝酸鹽的活化特別重要。利用 PCR 複製 CYP2E1 的一段基因，再以 Dra I 或 Rsa I 限制酶作用，經電泳，紫外線照射，如果是正常型(wild type)得到較短的片段，如果是變異型(variant)，片段較長。結果發現東方人出現變異型的比率約 20%，但西方人低於 10%，以 Rsa I 得到純合性變異型(homozygous c2 variant)者，出現鼻咽癌的危險性增為 7.7 倍；以 Dra I 得到純合性變異型者，出現鼻咽癌的危險性增為 5 倍，後來經大規模 364 名鼻咽癌病患的研究結果，發現以 Rsa I 得到純合性變異型者，出現鼻咽癌的危險性增為 2.6 倍，如果表現在非抽煙者，則增為 9.3 倍，因此遺傳有 CYP2E1 變異型者，比較易罹患鼻咽癌(Hildesheim, 1997)。這種遺傳因素也表現在鼻咽癌高危險區的正常人鼻咽上皮，香港廣東人的正常鼻咽上皮細胞，在 3p 染色體出現 LOH 的比率是 73.9%，而在安徽、北京的華人及西方人者只有 20% 出現 LOH，表示來自高危險區者之正常鼻咽表皮細胞 3p 染色體，比較容易受到破壞，而導致較高比率出現鼻咽癌(Chan, 2000)。

### 3. 吸入各種刺激性的煙氣：

長期暴露高濃度的各種煙塵，得鼻咽癌的可能性較高(Yu, 1981; Armstrong,

1983)，台灣的報告顯示長期工作於通風不良的環境，得鼻咽癌的危險性比正常人高 2 倍以上(Lin, 1979)。另外吸進甲醛(俗稱福馬林，如：新的木製衣櫥常有刺激性甲醛氣體)的量越多，得到鼻咽癌的危險性越高(Blair, 1986; Roush 1987; Vaughan, 1986)。至於和抽煙的關聯性，大部份的報告認為無關(Chen, 1986, 1990)，但有的認為有關，每天吸 20 支以上者，得病之比率為正常人 2 倍以上(Lin, 1973, 1979, 1990)。此外國外有人報告家庭內燃燒蚊香及點拜拜用的柱香、鋸木屑等可能與鼻咽癌有關，但台灣的報告沒有顯示相關性，倒是常使用鼻內刺激性油、精者，可能與罹患鼻咽癌有關(Lin, 1973, 1979)。

#### 4. 飲食因素：

香港、馬來西亞、加州的報告，認為小時候吃鹹魚會增加得鼻咽癌的機會，因為鹹魚含有亞硝基胺(Ho, 1972; Yu, 1981; Armstrong, 1983)。但台灣的報告沒有找出相關性，何況台灣地區吃鹹魚的人也少，倒是小時候常吃豆類發酵製品、燻肉者，與得鼻咽癌較有關，可能也是亞硝基胺之故(Ward, 2000)。其他吃鹹蛋、鹹肉、喝酒、喝茶、嚼檳榔都沒有相關性(Lin, 1973, 1979)。香港的研究報告發現居住於船上的人，很少吃新鮮食物，導致營養不良，維他命缺乏，特別是 A 和 C，得鼻咽癌的機會增加(Ho, 1972)。

綜觀上述的各種相關因素，在台灣與鼻咽癌有關的有：1. EB 病毒的感染。2. 遺傳因素。3. 工作地點通風不良、煙塵過濃。4. 從小吃豆類發酵食物、燻肉。可能相關的因素有：1. 抽煙，尤其一天 20 支以上者。2. 使用鼻內刺激油、精等。因此若常接觸到上述各種與鼻咽癌有關的環境因素，尤其是家族內有人得鼻咽癌者，或血清中對抗 EB 病毒的抗體較高者，則罹患鼻咽癌的可能性將大為增加。

### 三 鼻咽癌的診斷

所謂鼻咽癌，簡單的說，就是源自鼻咽部上皮組織的一種惡性腫瘤，由於它源自非常隱密的死角——鼻咽部，使得它不易被發現出來。它約略位於頭顱部的中心區，就如一個球體的球心，不論自鼻或口，都不易直接檢查此區域。但是由於此空腔，正位於鼻腔後方、口咽上方，歐氏管(也稱耳咽管因其連接耳部和咽部)的咽側開口也在此處，因此它的臨床表現就容易以耳或鼻部症狀來表現，又因為鼻咽部就緊臨頭顱底部，許多的腦神經都於此附近通過而到他處，一旦受鼻咽部病變之影響，就可能產生頭痛或其他神經麻痺的現象；此外，鼻咽癌有一個特點，就是常在疾病早期即發生轉移，除了肺、肝和骨骼外，頸部轉移而使病患頸部出現腫塊，更是屢見不鮮。

由於耳咽管機能受影響，就可能出現一些類似耳咽管機能障礙的現象，諸如耳鳴、耳內阻塞感、聽力障礙以及說話時患側耳部出現回音的自聲過強現象，由於這種耳咽管機能障礙也常出現在鼻或鼻竇有毛病的病人，因此有時並未引起注意，甚至到了中耳壓力不平衡，引起耳膜凹陷甚或中耳積液的程度，此時一定要檢查鼻咽部。

若腫瘤阻礙了鼻腔通往鼻咽部的後鼻孔通道，則會影響鼻腔機能而出現鼻塞、流鼻涕、鼻涕帶血等鼻部症狀；由於鼻腔的血液供應來自外頸動脈和內頸動脈系統，血液供應充足，輕微的流鼻血或鼻涕帶血常不引起重視，而鼻部有鼻塞、流鼻涕問題的人也司空見慣，這也是引起延誤的一個原因。有時鼻咽癌本身出現出血現象，導致血痰現象的產生，但因血痰的原因很多，除鼻腔、鼻咽外、口腔、口咽、下咽、喉、氣管等等都有可能、此類病患常於內科就診並接受胸部 X 光檢查顯示正常之後，即放棄了追蹤血痰來源的決心，因而延誤了診斷。

由於衛生教有的普及，頸部出現腫塊常會引起病患恐懼感，若能因此而使病患及早就診，這毋寧也是一種好現象；據估計，頸部腫塊的原因，80%源自頭頸部，因此讓耳鼻喉科醫師做一詳細檢查，實在是必需的，尤其是準備做頸部切片檢查之前，更應有耳鼻喉方面的檢查才對，因為統計結果顯示，對鼻咽癌患者的治療而言，頸部接受切片者比未接受頸部切片檢查療效較差。由於正常人的頸部即存有不少的淋巴結，所以要做正確診斷，非須專業的知識不可。不過大致說來，位於頸部淺層、大小在 2 公分以下的可動性淋巴結，常是良性的；但是若淋巴結出現在深層，這些位於上頸部、於胸鎖乳突肌內側的腫塊，是鼻咽癌發生頸部轉移的典型位置，千萬不可掉以輕心。雖然頸部腫塊的出現，對鼻咽癌病患而言，等於是癌瘤細胞已自鼻咽的原發部位擴展到了頸部，但是適當的治療，仍有機會使碩大的頸部腫塊消退。

鼻咽癌的另一大類症狀，即是和顱神經有關的現象，諸如頭痛(尤其是單側性頭痛)、臉部麻木感、複視、眼球運動異常以及其他種種神經障礙或麻痺的症狀，也是必須提高警覺的，現在由於耳鼻喉科、神經科和眼科三部門的充分合作，使得因顱神經症狀而到神經科或眼科的病患，也能儘早的找出正確的病因，不致耽誤了鼻咽癌的診斷和治療。

對鼻咽癌的診斷和治療而言，病患和醫護人員的警覺性和充分合作，是早期診斷、早期治療的先決條件。鼻咽癌雖然位於隱密的死角，但在鼻咽鏡檢查下，腫瘤常是無所遁形的；萬一病患有咽部敏感、嘔吐反射過強的情形時，適度的使用一些局部麻醉劑和藥物，也可以達成檢查的目的。此外，現在醫療儀器發達，

以台大醫院耳鼻喉科門診為例，在不引起病患的不適下，軟式鼻咽鏡以及硬式鼻咽鏡自鼻或口施行檢查，更是大大提高了鼻咽癌的診斷率。

臨床上診斷為鼻咽癌之後，一定要做鼻咽部的切片檢查，經病理學家證實為惡性腫瘤後，才能進一步進行治療。若不幸被診斷罹患鼻咽癌後，耳鼻喉科醫師會寫照會單，照會放射線科醫師；安排各種定位腫瘤之檢查，如：鼻咽部電腦斷層攝影或磁振影像攝影，以及有無遠隔轉移的篩選檢查，即胸部 X 光攝影，骨頭掃描及肝臟超音波等。有效的治療，來自於正確的治療方針，而方針的選擇，卻有賴於確實可靠的診斷與病灶範圍的認定。在解剖上，鼻咽是一個醫師不容易用肉眼直接看或用手觸診的結構。因此，臨床上對鼻咽癌的診斷，須依靠鼻後鏡或鼻咽內視鏡與醫學影像的幫忙。用鼻後鏡或鼻咽內視鏡檢查鼻咽，好比是用潛望鏡直接伸入屋內查看牆上的表面是否有異常，而牆壁本身的結構及牆壁以外，則有賴醫學影像檢查，否則無法一探究竟。電腦斷層掃描攝影(computed tomography，簡稱 CT)及磁振影像(magnetic resonance imaging，簡稱 MRI)，是目前普遍使用於鼻咽癌診斷的醫學影像術。CT 及 MRI 可提供各種切面的數位化影像，呈現鼻咽部內的結構與病灶。如能仔細地選用造影參數，配合醫師的審慎判讀，就現階段的醫療水準而言，對於鼻咽癌的診斷與擴散範圍的認定，CT 與 MRI 兩者各見優劣。CT 對骨質解析度較高，MRI 對軟組織解析度較優；值得一提的是，CT 與 MRI 的檢查均需注射對比劑。儘管產生對比的原理不同，但兩者對比劑皆需由靜脈給藥，再經由血液循環將對比劑帶至病灶處，藉以突顯病灶與鄰近正常組織間的對比度，以增加病灶的偵測敏感度與準確度。除了呈現鼻咽癌在鼻咽處的腫瘤大小外，CT 及 MRI 可幫助確認腫瘤的擴散情況，如鼻腔、鼻竇、鼻咽旁、顛下窩、頸動脈鞘、脊椎及脊椎周圍肌肉群、口咽、顛底及顛內等。這些部位是否有腫瘤的侵犯，會直接影響治療方針的決定與治療的效果；除了原發癌及直接侵犯鄰近結構的評估外，影像檢查對癌轉移的診斷更是不可或缺，如頸部淋巴結、肺部與胸廓、肝臟、脊椎與骨骼系統等器官轉移的診斷，必須依靠 X 光檢查、CT、MRI、超音波及核子醫學等影像技術，才可能評估轉移的有無與範圍。對於經過治療後的鼻咽癌病患的療效評估，除了臨床上及實驗室各項檢查外，影像的追蹤檢查也是重要的步驟。這些追蹤檢查除評估治療效果之外，也可偵測是否有腫瘤復發或遠端轉移(TCOG, 2000)。

## 四 鼻咽癌的分類與治療

各醫院大多沿用世界衛生組織(WHO)於 1978 年提出並於 1991 年修正的鼻咽癌病理分類法。世界衛生組織 1978 年的分類法，將鼻咽癌區分為:Type I --角化鱗狀細胞癌(keratinizing squamous cell carcinoma)，其癌細胞有典型的鱗狀上皮角化特質。Type II --未角化癌(non-keratinizing carcinoma)，其癌細胞型態較多樣化，其中多角型細胞(polygonal cell)、梭狀細胞(spindle cell)等，都可見到。癌細胞間有清楚的界限。有些癌細胞甚至呈現鱗狀細胞分化現象。癌細胞群與淋巴間質之間，有清晰的界限。Type III --未分化癌(undifferentiated carcinoma)，其癌細胞沒有特殊的分化，癌細胞間的界限不清楚，細胞質不多，細胞核大而成空泡狀，並可見到清楚的核仁。癌細胞群常被大量淋巴細胞所浸潤，而形成癌細胞與淋巴細胞混雜難以分辨的特殊現象。世界衛生組織 1991 年修正的分類法，仍保留角化鱗狀細胞癌(Type I)的分類項目，並將未角化癌和未分化癌收納在未角化癌(Type II)項目中，再把未角化癌成分化型(Type IIa, differentiated)和未分化型(Type IIb, undifferentiated)二種，名稱雖有改變，但實質與 1978 年的分類法相差不遠。1991 年與 1978 年鼻咽癌分類法之比較：1991 分類法 Type I 角化癌等於 1978 年分類法 Type I；1991 分類法 Type II 未角化癌分為 Type IIa 分化型及 Type IIb 未分化型，前者等於 1978 年分類法 Type II，後者等於 1978 年分類法 Type III (Shanmugaratnam, 1978, 1993)。

根據 1997 年美國癌症聯合委員會的分類，如果腫瘤只局限在鼻咽腔，便是第一期；如果侵犯到鼻腔或口咽，或一邊頸部已有小於 6 公分長徑的轉移性淋巴結，便屬第二期；如果腫瘤侵犯顱底骨頭或鼻竇，或兩側頸部都有小於 6 公分長徑的轉移性淋巴結，便是第三期；如果腫瘤侵入腦內或侵犯顱神經，顱下窩、下咽或眼窩，便是第 IV<sub>A</sub> 期或頸部有大於 6 公分的淋巴結，或鎖骨上窩有淋巴結，便是第 IV<sub>B</sub> 期；如果腫瘤有遠隔轉移，便是第 IV<sub>C</sub> 期(AJCC, 1997)。

如果是第一、二期的鼻咽癌，我們便直接以直線加速器產生的伽瑪射線治療；如果是第三、四期，使先給予化學治療，再加上放射合併化學治療。病人在放療之前，都必須做固定面模，鉛板擋塊，及製作驗證片。

病患在行放射治療前都要會診牙科成口腔顎面外科醫師，評估牙齒及牙齦狀況，如有厲害的牙齦疾病或蛀牙，則在治療前要先治療或拔牙，拔牙後要等齒槽傷口完全復原才可開始放射治療，好的牙齒或可以修補的牙齒不一定要拔。氟膠及牙托使用及注意口腔衛生，可以使牙齒保持健康。

在台大醫院，一般的治療計劃是:每天給予照射 200 單位(cGy)，只需幾分鐘的時間，一星期照射五天；或每天照射兩次，一次 150 單位(cGy)。前半段是左右側面大範圍輪流照，接著後半段的治療，是側面的照射由大範圍縮為小範圍，加上由前上側方及前後的照射。總共鼻咽部要照射 7000 單位，頸部要 5000 至 6000 單位。

放射治療期間，口腔粘膜就像被火燒傷，宜少吃刺激、辛辣的食物，不可忌口，也沒有特別禁忌那些食物不能吃，以補充體力。若實在痛得難以進食，可以予靜注點滴，補充水分、糖分、鹽分及其他電解質，或吃止痛藥及口內噴類固醇製劑。又口腔唾液會變得黏稠，不易咳出，可用食鹽水和小蘇打水溶液漱口，或隨身攜帶水壺補充水分，保持口腔濕潤，同時要注意口腔衛生，常常漱口，避免以硬毛牙刷刷牙，免得黏膜受傷。耳鼻喉若有分泌物，宜給耳鼻喉科醫師治療，

避免黏連。聲帶腫脹、聲音沙啞，不必緊張，宜少說話，可以做蒸氣吸入治療，加速消腫，等治療結束，黏稠痰液減少，便會好轉，治療部位要儘量保持乾燥，不要用肥皂或其他任何含金屬的藥劑，以免加重黏膜或皮膚的傷害。頸部皮膚會有變黑、脫皮的現象，不要勉強抓掉，讓其自然脫落。若有皮膚脫皮潮濕的現象，可抹燙傷藥膏。治療期間不宜亂服中藥或草藥，應按時治療，不能任意間斷(Ko, 1988)。

鼻咽癌病人完成治療後，宜定期追蹤。腫瘤復發的病人約有 80%是在兩年內發生，此後逐年遞減，超過五年以後，疾病復發的機會低於 5%，極少數的長期存活者會出現放療引起的肉瘤(Ko, 1996)。所以，前兩年追蹤回診應該較為密集，一般建議一到三個月回診一次。兩年以後，約三到六個月回診一次。在兩次約診之間，如有不適，則應儘速回診。鼻咽癌經治療後容易復發的部位和治療前癌症散佈情況有關，主要包括鼻咽本身和其鄰近組織、頸部淋巴結、骨骼、肺臟及肝臟等。因此，病人追蹤檢查應以上述部位為重點，除常規身體理學檢查外，鼻後鏡或鼻咽內視鏡、血液檢驗、EB 病毒抗體之檢測、胸部 X 光常被列為例行檢查。特殊影像學檢查，如電腦斷層掃描攝影、磁共振影像檢查、骨骼同位素掃描或肝臟超音波檢查，一般需配合臨床需要來安排。大致而言，治療完成時間愈久，檢查密集度和檢查項目就愈少(TCOG, 2000)。

台灣鼻咽癌的治療成果是世界之冠。台大醫院病例的五年存活率(一般癌症療效的評估以五年存活率為準)，1958 年以前用 X 光深部治療的時期，只有 12%。改用鈷六十照射後，存活率漸漸提高到 47.8%；78 年以後，合併化學療法，目前的存活率已達 80% (Huang, 1985)。晚期的鼻咽癌因為容易出現遠隔轉移，只用放射線治療的第 IVA 及 IVB 期之五年存活率，分別為 35%和 28%。因為 mitomycin C 對缺氧及生長週期外的細胞都有殺傷力，為了解含 mitomycin C 的化療處方是否可預防晚期鼻咽癌的遠隔轉移及提高存活率，最近以 Mitomycin C、Epirubicin、Cisplatin、5-Fluorouracil 及 Leucovorin (MEPFL)加上後續的放療治療晚期的鼻咽癌，蒐集 100 名鼻咽癌病人併有明顯顱內侵犯，或大於 6 公分頸部腫瘤，或血清 LDH 濃度上升，或有鎖骨上或兩側頸部轉移者，於接受傳統的放療之前，先給予三個週期的化療，每一個療程三星期，包括第一天靜注 mitomycin C ( $8 \text{ mg/m}^2$ )，epirubicin ( $60 \text{ mg/m}^2$ )，cisplatin ( $60 \text{ mg/m}^2$ )，以及第八天靜注 5-fluorouracil ( $450 \text{ mg/m}^2$ )，leucovorin ( $30 \text{ mg/m}^2$ )。然後以 Kaplan-Meier product-limit 方法統計其存活率，和過去及目前已知的同期別之病人的存活率相比較。結果第 III，IVA，IVB 期的病人數分別為 17，24，59。追蹤期的中位數是 43(34-80)個月，五年保險統計存活率為 75% (第 III，IVA，IVB 期分別為 88%，58%，78%)，五年無遠隔轉移的比率是 82% (第 III，IVA，IVB 期及 N3a，N3b 分別為 94%，87%，76%，79%，74%)。結論是第 III，IVA，IVB 期及 N3 的良好五年保險統計存活率，可歸因於放療前 MEPFL 的功効(Hong, 2001)。

放射治療結束後，78.7%的人持續有口乾的現象，無法恢復，應該多喝水，或用 1%的小蘇打食鹽水漱口，及人造唾液來應付口乾。有 77.4%的人會有聽力障礙，應該求助於耳鼻喉科醫師，可使用鼓膜切開術或配戴助聽器來改善聽力，有 48.8%的人軟顎肌肉會纖維化，以致發生食物逆流至鼻腔、鼻音過重等現象，此時，進食不要吃得很快，一次不要吞太多；47.6%的人會有蛀牙，應該看牙醫師，用治療用軟毛牙刷，至少在放射線治療後兩年內不要拔牙，以免傷到上、下顎骨的軟組織，引起骨頭壞死；有 38.0%的人會有牙關緊閉的現象，因為咀嚼肌肉受到放射線產生纖維化，或是受到癌組織侵犯，因此在放射線治療當中或之後，要多做開口

動作，但是也不要太過度，以免造成運動傷害；頸部僵硬的人佔 32.2%，一樣是頸部肌肉纖維化的結果，應該要多做頸部柔軟動作；此外耳鼻部會有較多分泌物，應該每星期看耳鼻喉科醫師一次，保持局部的衛生。有 29.6%的人會有味覺不敏感的現象，因為口乾加上負責味覺的細胞被破壞之故，可多喝點湯，或是口味稍加重些。治療當中脫落的毛髮，在治療結束後會慢慢長出來；皮膚的變色及乾燥，在治療結束後的半年左右可以恢復；臉部及頸部會有浮腫的現象，尤其是早上醒來時，是因為頸部淋巴管受到放射照射而阻塞，引起淋巴水腫也是半年後會逐漸好轉。

因為鼻咽和大腦管內分泌的中樞，只隔著頭顱骨底部，所以在放射治療時，該中樞或多或少也會受到照射，此外，頸部的甲狀腺也在照射範圍之內，而引起內分泌失調，約有 70~80%的人會表現出某些內分泌功能低下的症狀，如整日疲倦、全身無力、記憶力減退、動作遲緩、怕冷、聲音低沉、講話很慢、皮膚乾燥、指甲易斷、頭髮變粗、不想吃東西、噁心、嘔吐、體重減輕或增加、臉部浮腫、腳部抽筋、便秘、臉部浮腫、性慾減退、性無能、月經延遲、無月經等現象。若有上述幾項現象，便要抽血檢查內分泌，若有功能低下，要看內科內分泌醫師，補充缺乏的荷爾蒙，如此便可以改善生活品質，而接近正常生活(Ko, 1988)。

隨著放療技術和機器的進步，以及保護措施的精進，上述後遺症的比率已下降許多，程度也較輕微，絕大部份存活的病人都可像正常人一樣生活與工作。放射線治療結束後，可用以預測遠隔轉移的變數不多。當然愈末期，轉移到他處的機會愈大，但是早期的鼻咽癌，仍是有遠隔轉移的機會。另外，距離治療結束的時間愈久，遠隔轉移的機會愈小，一般有五年以上的人，很少會發生轉移，但這些關係並不是絕對的，以 Cox 多變數分析，發現治療前血清 LDH 濃度上升，以及化療後放療前頸部腫瘤再變大，是容易發生遠隔轉移的兩個不好預後因素(Hong, 2001)。因此，治療結束，後仍要注意有無轉移的現象，如果有固定一處的骨頭疼痛、壓痛，甚至下肢麻木，無力或麻痺的現象，或肚子脹，右上腹部脹痛；或持續性的咳嗽、胸痛，甚至呼吸困難等，便要懷疑是否有轉移。

放射線照射是治療鼻咽癌的主要方法，效果良好，但與所有癌症治療一樣，仍不免有少數復發的現象。局部復發的鼻咽癌，再度體外放射治療國內仍然約有 15-35%的五年存活率，但是第二次的放射治療很可能造成較嚴重的放射線傷害，因此病人需與主治醫師詳細討論。鼻咽部復發的鼻咽癌，可考慮作顱底手術切除，有機會可完全切除，或考慮合併化學治療。大致而言，傷口因放射線照射過癒合較慢，且顱底手術相當繁複，術前需與主治醫師詳細討論。頸部殘留腫塊或復發，則施行頸部廓清術或放射治療。總之，及早發現鼻咽癌復發，施以適當治療，病人較有第二次治癒的機會。

一旦不幸發生遠隔轉移，少數的病例，因發現得早，只單獨一顆腫瘤出現於肝臟或肺臟，接受手術切除後，仍然得以長期存活。可是大多數沒有如此幸運，但採用 MAPFL 的處方治療鼻咽癌的遠隔轉移，嚴格地針對 32 名有可計量的轉移性肝臟或肺臟腫瘤病人，先每三星期給三種藥(MAP)，最多四個療程，然後再每星期給兩種藥(FL)，一直給到病情惡化，沒有反應，再換其他的藥以為救援。結果只有兩名發生嚴重的感染，其中一名不幸死於敗血症。整體而言，安全性、可行性以及病人的接受度很高。有兩名病人的腫瘤完全消失，九名病人的腫瘤只剩一點點，十九名病人的腫瘤縮小一半以上，只有兩名沒有反應，總共有效率是 94%(30/32)，結果是最好的，最重要的是存活的中位數高達 18.1 個月，也是最近國內外的文獻當中最長的，其中有六名病人在追蹤了 9 到 41 個月時仍然存活，最



久已活了三年多(Hong, 1999)。

## 五 鼻咽癌的基因學

台灣的鼻咽癌和抽菸、喝酒沒顯著關係，大多數病人有較高的抗 EB 病毒血清力價，而遺傳因素可解釋 50% 的以上的危險性(Chen, 1986, 1990)。臨床上有 8% 的鼻咽癌病人具有家族史，包括一等親、二等親(含孿生子)及三等親，在有生之年也出現鼻咽癌(Hsieh, 1971)。另外在臨床上發現鼻咽癌和其他頭頸部癌如口腔、口咽、喉及下咽癌的生物特性不一樣，如鼻咽癌對放射線或抗癌藥物敏感，比較容易遠隔轉移等，因此治療以放射和化學治療為主(Zhang, 1989; Ko, 1993b, 1998e; Cheng, 2000)；其他頭頸部癌，尤其口腔癌則和抽菸，喝酒、嚼檳榔有顯著關係，單獨抽菸、喝酒、嚼檳榔罹患口腔癌的危險性，分別是沒有任何嗜好的 18、10、28 倍；合併抽菸和喝酒、抽菸和嚼檳榔、喝酒和嚼檳榔，罹患口腔癌的危險性，分別是沒有任何嗜好的 22、89、54 倍；有抽菸、喝酒、嚼檳榔三種習性者，罹患口腔癌的危險性，是沒有任何嗜好的 123 倍，值得注意的是：單獨嚼檳榔罹患口腔癌的危險性，比合併抽菸和喝酒的危險性還高(28 倍比 22 倍) (Ko, 1995)。非鼻咽癌的其他頭頸部癌對放射線較不敏感，治療以手術配合術後放射線治療為主(Ko, 1998a, 1998e)。口腔癌的每十萬人口粗發生率，隨檳榔種植面積及嚼食人口的遽增而一直在增加中，據農委會的估計，檳榔種植面積由民國六十五年的 1,878 公頃，一直增加到民國八十四年的 54,000 公頃；產量由民國六十五年的 16,000 噸，增加到民國八十四年的 156,000 噸；產值則由民國六十五年的 3 億，一直增加到民國八十四年的 132 億。終於在民國八十二年，口腔癌的發生率超越鼻咽癌，而為台灣最常見的頭頸部癌症。民國八十六年，口腔惡性腫瘤發生個案數佔全部惡性腫瘤發生個案數的 5.16%，口腔惡性腫瘤死亡人數佔全部惡性腫瘤死亡人數的 4.01%。發生率的排名於男性為第四位、女性為第十六位；死亡率的排名於男性為第五位、女性為第十五位。民國八十六年初次診斷為口腔惡性腫瘤者共計 2,405 人，佔十大癌症發生率的第八位，每十萬人口粗發生率為 11.12，每十萬人口年齡標準化發生率為 10.66。其中男性 2144 人，女性 261 人，男女別 7.76:1，年齡中位數分別為 52.0 歲、61.0，每十萬人口粗發生率分別為 19.29、2.48，每十萬人口年齡標準化發生率分別為 18.62、2.40。民國八十六年死因為口腔惡性腫瘤者共計 1,163 人，其中男性 1,041 人，女性 122 人，男女別 8.17:1，年齡中位數分別為 54.0、65.0 歲，每十萬人口粗死亡率分別為 9.37、1.16，每十萬人口年齡標準化死亡率分別為 9.15、1.12 (Department of Health, 2001)。

目前遺傳學方面的研究，顯示 DNA 對基因突變劑的感受性和環境致癌過程有密切的關係。在我們生活的環境中，自然存在一些致癌物質、基因突變劑、X 光、紫外線等會破壞 DNA 的物質。如果一個人的 DNA 修補能力不好，則會累積較多的突變基因或染色體的異常，則致癌的可能性便會增加。1986 年 Gantt 等使用鹼性析出法(alkaline elution technique)，提出生物化學方面的證據，顯示 DNA 的修補能力不好，會導致 G2 期染色單體對放射線的敏感度增加，而容易致癌。他們的發現支持，G2 期染色單體對放射線敏感性的增加，是肇因於 DNA 修補能力不好的觀念。因為對基因突變劑的感受性，可間接顯示 DNA 的修補能力，所以若能找到一種方便的基因突變劑，則對環境致癌過程方面的研究，會有很大的幫助。

基因毒性效應類似放射線的 bleomycin 是一族 glycopeptide 的抗生素，其細胞基因毒性效應是使 DNA 的鹼基游離出來，及 DNA 骨架的斷裂(Burger, 1981)。和 DNA 修補有關的聚合酶(Huet, 1985)及 calmodulin 之抑制物(Smith, 1986)，可增強



bleomycin 的毒性，因此 bleomycin 的作用可作為 DNA 修補能力的間接標記。Hsu 等發展以 bleomycin 30 $\mu$ g/mL 作用於周邊血液之淋巴球，以每個細胞的平均染色單體斷裂數表示其基因毒性，發現在與外界有相交通之器官有癌症的病人，有顯著高的平均染色單體斷裂數，他們的結果顯示對基因突變劑的感受性，可能在和外界有直接交通的器官或系統(如：呼吸、消化及皮膚等)之致癌過程，扮演重要的角色(Hsu, 1989)。

如前述，非鼻咽癌的其他頭頸部癌症和抽菸，喝酒、嚼檳榔有顯著關係，但是有上述三種習性者也只有少數出現頭頸部癌，因此對外來基因毒害劑的感受性，被認為在致癌過程中佔有一個重要的角色。在一般族群中，存在著不同程度的修補 DNA 之能力，以 bleomycin 來測試對誘變劑的感受性，可作為對癌症感受性及出現第二個原發腫瘤的一種生物標記(Schantz, 1989)。

由於癌症是一種基因疾病(Kinzler, 1996; Lengauer, 1998)，不管是遺傳，致癌物質或病毒，都是在基因組的某些部位發生病變，導致一連串致癌基因的活化及抑癌基因的去活化(Knudson, 1993)，偵測這兩種基因變化最直接的方法，便是看看基因有無增幅或缺失。比較型基因組雜交法(comparative genomic hybridization) (du Manoir, 1995)在一次實驗，可得知一個癌症所有染色體基因的增減情形，縮小研究範圍到某染色體的某些區段，再進一步做一些比較專一性的研究，如失異合性(loss of heterozygosity) (LOH)，偵測突變點或基因定位等，才能找出與致癌過程相關的致癌基因及抑癌基因(Kallioniemi, 1992, 1994, 1995)。本研究的目的是，為了明瞭鼻咽癌所有染色體基因的增減情形，有助於進一步深入研究與鼻咽癌相關的致癌基因及抑癌基因。癌症的形成大都是一連串基因變化所致，如病毒或致癌物質可引起致癌基因的活化，或抑癌基因的去活化，其中抑癌基因的去活化是癌細胞形成最常見的現象，雖然抑癌基因的去活化有很多機轉，找出腫瘤細胞失去的染色體片段，再從中找尋可能含有的抑癌基因是一種有效的方法(Weinberg, 1991)。來自雙親的兩個同源染色體，若其中之一有一段缺失，謂之有失異合性。若癌細胞有失異合性的情形，可推測或找到該缺失段可能有抑癌基因。熟為人知的 *Rb* 基因，必須兩個同源染色體的等位基因都缺失，才會長出視網膜胚細胞瘤，但 *p53* 基因只要有一個等位基因發生突變，造成負面優勢(dominant negative)時，便可引發腫瘤形成，可見抑癌基因之缺失的可怕(Watson, 1992)。目前的報告指出在鼻咽癌檢體或細胞株(Kristensen, 1991; Waghray, 1992; Sizhong, 1983; Mitelman, 1983)，以及有部份病例在第 3 對染色體某一段有缺失的癌症，包括：頭頸部癌(Hu, 1996; Huang, 1991; Nawroz, 1994; Rowley, 1996; Ko, 1998c; Kok, 1997)，子宮體癌(Jones, 1994)，間皮瘤(Zeiger, 1994)，其中有 48% 的頭頸部癌在第 3 對染色體的短臂至少有一小段缺失(Rowley, 1996)。有部份病例在第 9 對染色體有缺失者：頭頸部癌(Huang, 1994; Nawroz, 1994)，腎臟、膀胱癌(Cairns, 1994, 1995)，子宮體、卵巢癌(Cheneix-trench, 1994; Jones, 1994)，胃癌(Sakata, 1995)，其中有 72% 的頭頸部癌在第 9 對染色體的短臂，至少有一個多形標記有失異合性(Nawroz, 1994)；及部份病例在第 11 對染色體有缺失者：頭頸部癌(Hui, 1996; Nawroz, 1994)，胃癌(Baffa, 1996)，乳癌(Zhuang, 1995)，其中有 54% 的鼻咽癌在第 11 對染色體的長臂，至少有一個多形標記有失異合性(Hui, 1996)。另外在整個致癌過程的基因變化中，最常見的是抑癌基因的去活化，由於抑癌基因的去活化最常見於，一等位基因的缺失加另一等位基因的點突變。為了進一步了解鼻咽癌細胞染色體上更小區段的缺失，借助看 LOH 的情形，可得知更詳細、更精確的基因缺失現象。因為每對同源染色體當中，一條來自父親，一條來自母親，其中有很多多形標記，可區分何

者來自父親，何者來自母親，所以有異合性(heterozygosity)。以前利用有多形性，含有許多重複序列的微衛星標記(microsatellite marker)，附上放射性同位素於引子，經 PCR、電泳、曝光，比較正常細胞和癌細胞的多形標記，如果癌細胞有一條標記不見了，或是含量是正常細胞的一半以下，謂之有 LOH，表示該標記所在染色體區段附近，可能有重要的抑癌基因，因細胞失去該基因，加上另一等位基因有點突變而致癌。由於使用同位素較麻煩、費時，所以斷斷續續出現報告，指出鼻咽癌在第 3, 9, 11, 13, 14 對染色體有 LOH (Huang, 1991, 1994; Hui, 1996; Cheng, 1997)，尤其 9p21-22 有純合性缺失(homozygous deletion)。後來有附上不同顏色的螢光標記(Cawkwell, 1993)，藉助電腦化，可以安全又快速處理龐大資料，所以可以做全基因組的失異合性定位，利用含有三種螢光之一，分布於 23 對染色體上的 382 個微衛星標記，進行複合式 PCR (multiplex PCR)，一支反應試管可放入多個標記的引子，電泳時同一電泳槽可放入同長度、不同顏色，或不同長度、同顏色的標記，經雷射激光，電腦記錄、判讀，可比傳統同位素法快上幾十倍，但是利用雙核苷酸重覆序列的微衛星多形標記，來看失異合性之 informative rate (可分辨出兩尖峰之多形性的比率)並不很高，約 50%，效率打折扣。以 informative rate 較高的四核苷酸重覆序列的多形標記，進行失異合性的定位，效率較好，比較不會作虛功。結果發現鼻咽癌失異合性的比率依次是：3p(96.3%)，9q(88.9%)，9p(85.2%)，14q(85.2%)，11q(74.1%)，12q(70.4%)，13q(55.6%)，16q(55.6%)，5q(44.4%)，12p(44.4%)，1p(37.0%)，表示位於上述染色體之抑癌基因的去活化，在鼻咽癌的致癌過程，扮演相當關鍵的角色(Broman, 1998; Lo, 2000)。因為使用 CGH 或看 LOH，鼻咽癌細胞 3p，9p 的缺失都很常見，尤其 9p21-22 有純合性缺失，表示該區段的抑癌基因在鼻咽癌的致癌過程是很常見及最關鍵的，因此位於 9p21 的 *p16* 基因變成為熱門研究重點。*p16* 基因又名 multiple tumor suppressor 1(MTS1)基因，或 *CDKN2* 基因，可轉譯出 p16 蛋白質，抑制 cdk4/cyclin D 複合體的催化活性，抑制細胞週期(Lo, 1995)。至於 3p 上的抑癌基因，和鼻咽癌比較有關的是位於 3p14.2 的 *FHIT* (fragile histidine triad) (Ohta, 1996; Luan, 1997)和 3p25 的 *VHL* (von Hippel Lindau)基因，但目前少有鼻咽癌和 *FHIT*，*VHL* 之關係的研究。儘管鼻咽癌臨床治療的成績已經很好，但是其罹患率以四十五歲上下，正值人生最輝煌燦爛的壯年期最高，為了能夠以分子基因學的研究，更早期發現鼻咽癌，進一步增進治療結果，同時期望在第 3、9、11 對染色體上發現更小區段的 LOH，找出導致鼻咽癌的抑癌基因，以及看 *FHIT* 及 *p16* 基因在鼻咽癌細胞有無突變，而有本研究。

# 研究方法與材料

## 第一部份: Bleomycin 試驗

蒐集國立台灣大學醫學院附設醫院耳鼻喉部鼻咽癌(NPC)、口腔或口咽癌(ORC)、喉或下咽癌(LHC)及非癌症的病人各 35 名。每人抽血 5mL 放入含有肝素(heparin)的管子，儲存於 4°C 冰箱，不超過 48 小時。使用植物血凝素(Murex Diagnostic, Dartford, England)作為淋巴球之促進有絲分裂劑，把 5mL 無菌蒸餾水加入一瓶約 45mg 的植物血凝素備用。每個人都做 2 支血液培養，內容物包括 3.6mL RPMI-1640 (Atlanta Biologicals Inc, Norcross, GA), 0.75mL 20%小牛血清 (Tissue Culture Biologicals, Tulare, CA), 0.075mL 植物血凝素, 0.075mL 青黴素(10,000 IU/mL)、鏈黴素(10mg/mL) 及 amphoterin B (0.025 mg/mL) (Biological Industries, Beth Haemek, Israel)水溶液和 0.5mL 血液，放入 37°C 培養箱(含 5% 二氧化碳)計 72 小時。在第 67 小時加入 bleomycin 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用 5 小時。Bleomycin (Nippon Kayaku Co, Tokyo, Japan)水溶液的製備，是泡成 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的濃度，再分裝置於-20°C 冰庫備用。在第 71 小時，每支血液培養各加入 100  $\mu\text{l}$  的 Colcemid (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)作用 1 小時，使有絲分裂固定在中期(metaphase)。滿 72 小時後，再倒入尖端試管，以 300g 離心 5 分鐘。把上層液吸掉後，加入 5mL，低張液之 0.075mole/L 的氯化鉀溶液，於室溫靜置 20 分鐘，再離心。除去上層液後，慢慢加入 5mL 的 Carnoy 固定液(甲醇:乙酸=3:1)，再於室溫靜置 20 分鐘。重複上述步驟，再以 5mL 固定液清洗，最後泡成 0.5mL 的溶液。取一、二滴溶液滴在微溼的玻片上，再以 5%的 Giemsa 溶液(Diagnostica Merck, Darmstadt, Germany)染色 4 分鐘。每張片子都給予一密碼，以油鏡放大 1000 倍。觀察 50 個有絲分裂中期細胞。如果染色單體上的不染色區長度小於染色單體的寬度，且排列在同一線上，則定為裂隙(gap)，不列入記錄；反之則定為斷裂(break)。如果一個中期細胞的染色單體斷裂數大於 12，則定為只有 12 個斷裂。計算 50 個細胞的總斷裂數，再除以 50，求得每個細胞的平均斷裂數(b/c)。另外計算 2000 個細胞中，有幾個細胞進行有絲分裂，以%表示其有絲分裂的指數(mitotic index)。最後才解開密碼，以 Student *t* test 檢定四組病人數值的差別。

## 第二部份：比較型基因組雜交法

蒐集 25 名鼻咽癌病人，於作切片檢查時，取其鼻咽癌組織，以及住院接受手術的 26 名復發的鼻咽癌病人，取其復發的鼻咽癌組織。同時抽取其周邊血液，分別萃取癌組織及正常淋巴球之 DNA。

正常人中期細胞抹片的製備是先進行血液培養，10 mL 內容物包括 RPMI-1640 (Atlanta Biologicals Inc, Norcross, GA)，2% 植物血凝素，15 % 小牛血清 (Tissue Culture Biologicals, Tulare, CA)，和 0.5mL 血液，放入 37°C 培養箱(含 5% 二氧化碳)計 72 小時。然後加入 methotrexate 17 小時，之後再加入 thymidine，使有絲分裂固定在中期(metaphase)。最後蒐集淋巴球，滴在乾淨的玻璃片上。

將腫瘤組織的 DNA 用 nick translation 的方法，標上含綠色螢光的 dUTP (Vysis, Downers Grove, IL)，同一個病人的周邊血液淋巴球之 DNA 則標上含紅色螢光的 dUTP (Vysis, Downers Grove, IL)，這些‘探針’的長度介於 500 bp 到 3000 bp 之間，然後將 200 ng 有標示的 DNA 和 10  $\mu$ g 沒有標示的人類 Cot-1 DNA (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)混合，以酒精沉澱，再溶於 10  $\mu$ l 的雜交液(70% formamide/2  $\times$  SSC/10% dextran sulfate)<sup>3</sup> 到 4 分鐘。接著將這些探針混合液在 76°C 下變性 7 分鐘；中期細胞的染色體也在 76°C，70% formamide 水溶液(70% formamide/2  $\times$  SSC, pH 7.0)中變性三到四分鐘，然後將探針混合液滴到中期細胞染色體的玻璃片上，以橡皮膠封片，置於 37°C 的濕培養箱中雜交三天。雜交後，玻璃片在 43°C 下，以 50% formamide/2  $\times$  SSC 水溶液洗兩次，各十分鐘；接著在室溫下，以 PN 緩衝液(0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.1 % NP-40)洗三次，各十分鐘，最後在 Vectashield 封固基(mounting medium) (Vector Laboratories, Burlingame, CA)中，以 diamidino-2-phenylindole (DAPI) 將染色體染色。

借助 QUIPS XL 基因工作平台系統(Vysis)，從雜交後的染色體蒐集和分析螢光訊號，以裝備有 cooled charge-coupled device camera (Sensys, Photometrics, Tucson, AZ)的 Zeiss Axioskop 顯微鏡，靠 SmartCapture program 找到六到十個中期細胞的染色體，然後用過濾系統(Chroma Technology, Brattleboro, VT) 蒐集綠、紅、藍(DAPI 之染色)，以 QUIPS 軟體，將 6 到 10 個中期細胞染色體，綠、紅螢光的平均比率繪圖在個別的染色體，比率大於等於 1.2 表示基因增加；比率小於等於 0.8 表示基因缺失。

### 第三部份：失異合性

蒐集國立台灣大學醫學院附設醫院耳鼻喉部門診部 30 名鼻咽癌病人，於作切片檢查時，取其鼻咽癌組織，以及住院接受手術的 18 名復發的鼻咽癌病人(13 名位於鼻咽，5 名位於頸部)，取其復發的鼻咽癌組織。同時抽取其周邊血液，分別萃取癌細胞及正常淋巴球之 DNA，另外取得三個細胞株：HONE-1，CNE-1，CNE-2 (Glaser, 1989; Beijing, 1978)，然後萃取其 DNA 及 RNA，藉助 Cawkwell 等提出的方法，以位於第 3，9，11 對染色體上特定位置的 133 個附有螢光物質的微衛星多形標記引子(50 對為雙核甘酸重覆序列的多形標記；9 對為三核甘酸重覆序列的多形標記；74 對為四核甘酸重覆序列的多形標記)，平均間隔約 4 cM，放入分別含有正常細胞或癌細胞 DNA 的反應液中，進行聚合酵素鏈反應。微衛星多形標記是指一個約 100 到 300 個核甘酸片段中間有很多胞嘧啶和腺嘌呤(CA)的重複，因每個人重複的次數不盡相同，所以有多形性。Perkin-Elmer/Applied Biosystems (PE/ABI) 公司製造的微衛星多形標記之一個引子(primer)附有(FAM)，或(HEX)，或(TET)三種螢光之一，經雷射激發後，分別發出藍光、黃光或綠色光，以利區分。進行實驗時，取等量的一對引子，加上 1×Tris-EDTA 稀釋 20 倍，然後取出 1μL 加入 1μL，20 ng/μL 的 DNA，1μL 的 10× PC2 緩衝液，0.1μL 的 Taq 聚合酵素(5 units/μL)，1μL 的 2.5mM dNTP 及 5.9μL 的兩次蒸餾水，反應總體積為 10μL。聚合酵素鏈反應的條件是 95°C，5 分鐘，然後重複 94°C，15 秒；60°C，15 秒；72°C，30 秒，共 60 回，最後 72°C，10 分鐘。接著在加有 ethidium bromide 的 4% agarose 進行電泳，經紫外光照射確定有產物後，再各取 1μL 同顏色不同長度；或不同顏色長度相近的標記產物混在一起，加上 1× Tris-EDTA 稀釋成 20 倍，然後取 1μL 的混合產物加上 1.5 μL 的裝填緩衝混合液(甲醛:標準標記:裝填緩衝液=15:2:2)，在 90°C 作用 2 分鐘，使 DNA 變成單股，再裝填到 PE/ABI 377 DNA 分析儀的 4% polyacrylamide 膠片上。該膠片的製作是取 10.8g 尿素，加入 40% acrylamide 3mL，再加入 10× TBE 3mL，然後加兩次蒸餾水到 30mL 最後加入 10% ammonium persulfate (APS) 150 μL 及 TEMED 21 μL，使 acrylamide 聚合。進行電泳前，膠片要先經分析儀測試不含雜質後，再經雷射激發，蒐集訊息於電腦，再以 GeneScan™ 軟體記錄標記圖形之大小及面積，最後再依標記圖形的大小，調整裝填標記產物的量，重新記錄，使圖形利於判讀，如果癌細胞 DNA 的兩尖峰圖形有一個不見，或面積小於正常的一半，便有失異合性。然後利用 SAS 6.12 版的 PPROC FREQ 軟體，以 Fisher's exact test 分析有 LOH 的標記和原發腫瘤期別、頸部淋巴結期別、TNM 腫瘤期別的相關性。另外經反轉錄酵素-聚合酵素鏈反應，取得鼻咽癌組織及細胞株的 cDNA 後，利用橫跨 *FHIT* 的 exon 5 到 9 之引子，取得複製產物進行序列分析，同時也做 *p16<sup>INK4a</sup>* 及 *p19<sup>ARF</sup>* 的序列分析。

結

果

## 第一部份: Bleomycin 試驗

非癌症的病人、鼻咽癌(NPC)、口腔或口咽癌 (ORC)、喉或下咽癌(LHC)者的平均年齡分別是 46.7( $\pm$ 16.0)、45.9( $\pm$ 14.5)、50.1( $\pm$ 11.0) 及 60.4( $\pm$ 10.6)歲，LHC 者的平均年齡明顯比其他三組的高。4 組詳細的染色單體斷裂數及其平均值，非癌症、鼻咽癌、口腔口咽癌、及喉下咽癌者的平均染色單體斷裂數分別是  $0.80 \pm 0.32$ ， $1.03 \pm 0.45$ ， $1.30 \pm 0.44$ ，和  $1.35 \pm 0.46$ ，所有癌症病人比非癌症病人有顯著高的 b/c，鼻咽癌病人比口腔口咽癌及喉下咽癌者有顯著低的 b/c，ORC、LHC 的平均染色單體斷裂數，比 NPC、對照組者高，達統計學上意義。對照組的平均染色單體斷裂數加上一個標準差等於 1.10，如果染色單體斷裂數的平均值大於 1.10，吾人將其定為‘對 bleomycin 過度敏感’，則所有癌症病人比對照組都有較高比例的‘對 bleomycin 過度敏感’，同時 NPC 比 LHC 者也有較低比例的‘對 bleomycin 過度敏感’。



## 第二部份：比較型基因組雜交法

鼻咽癌檢體 51 個中，25 個原發腫瘤中有 8 個；26 個復發腫瘤中有 7 個，沒有顯現出明顯的染色體變化(癌細胞的比率佔 40%-90%)。總共有 131 個染色體變化(50 個缺失；81 個增加)出現於 17 個原發腫瘤中；有 118 個染色體變化(48 個缺失；70 個增加)出現於 19 個復發腫瘤中。原發腫瘤最常見的基因增加，位於 12p (59%)；而復發腫瘤最常見的基因增加，位於 11q (53%)。原發腫瘤在 12q、9p、11q、14q 出現染色體變化的比率，反而遠比復發腫瘤者高( $p < 0.05$ )。第 II 期原發腫瘤的平均染色體缺失有 0.8 個，平均染色體增加有 3.8 個；第 III、IV 期的平均染色體缺失各別有 4.0、3.8 個，平均染色體增加各別有 7.7、4.3 個( $p < 0.05$ )。

經 CGH 實驗後，發現主要有以下的變化：基因增加出現於染色體 12p(59%)，1q(47%)，17q(47%)，近中央節的 11q(41%)，12q(35%)，9q(24%)及 8(24%)，最小的重疊區段在 12p12-13，1q21-22，17q21，17q25，11q13 及 12q13；基因缺失的有染色體 3p(53%)，9p(41%)，13q(41%)，14q(35%)，靠遠端的 11q(29%)，5q(25%)及 16q(19%)，最小的重疊區段在 3p12-14，3p25-26，9p21-23，13q21-32，14q12-21 及 11q14-23。顯示位於上述染色體的致癌基因及抑癌基因，可能參與鼻咽癌的形成。

### 第三部份：失異合性

根據 3,787 個可提供訊息的資料，在這些鼻咽癌檢體的 3 個染色體上，平均每個檢體可有 78 (59%)個可供判讀的標記，有 70% (34/48)出現片段的等位基因缺失 (fractional allelic loss, FAL) ，FAL 在每個染色體臂的頻率是 3p : 96% (46/48) ， 3q : 85% (41/48) ， 9p : 42% (20/48) ， 9q : 71% (34/48) ， 11p : 38% (18/48) ， 11q : 92% (44/48) ， 染色體 3、9、11 上所有標記的等位基因缺失之頻率分別是 24%，20%及 21%，為了排除 FAL 可能是由於隨機的因素，以及避免癌症檢體中有正常細胞的干擾，只有十個以上的標本出現同一個等位基因的缺失，或等位基因缺失的頻率超過該染色體上者的平均數，才認為是有意義的 LOH，各個標記的位置以及等位基因缺失之頻率，可能存在的抑癌基因，這些結果顯示常見的缺失段位於以前報告過的 3p14-21(再縮小為 3p24.3-21.31 及 3p14.3-13)，9p21-23，11q13-21 (可再縮小到 11q14.3)和 11q21-23(可再縮小到 11q22.1- 23.2)，此外有 8 個新發現常見的缺失段位於 3p25.2-25.1，3q22.1-23，3q26.2-27.1，3q29，9q21.32-22.2，9q34.12-34.3，11p15.5-15.4 及 11q24.3-25。最後經過比對分析，可定出 3 段最小重疊的 LOH 區域：3p25.3-24.1 (D3S2403-D3S4535，< 19 cM)、3p23-21.31 (D3S1768-D3S1766，< 9 cM) 及 11q22.1-23.2 (D11S2000-D11S965，< 8 cM)，而且發生 LOH 的比率分別高達 75% (36/48)，65% (31/48)，67% (32/48)。

等位基因缺失和鼻咽癌分期相關性的統計分析，標記 D9S318、D11S1304 分別所在的 9q21.3-22.21、1q24.3-25 之等位基因缺失和 N2/N3 有顯著相關性 ( $p=0.035$ 、 $p=0.005$ )；標記 D9S905、D11S1304 分別所在的 9q34.1-34.3、11q24.3-25 之等位基因缺失和晚期的鼻咽癌有顯著相關性( $p=0.022$ 、 $p=0.017$ )。

為了分析參與鼻咽癌致病過程的已知抑癌基因，吾人選擇位於 3p14.3-13 的 *FHIT* 及位於 9p22.1-13.3 的 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 進行突變篩選，雖然 *FHIT* 所在的 3p14.3-13 之等位基因缺失和早期的鼻咽癌有顯著相關性，但是從 21 個鼻咽癌組織的 *FHIT*、*p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 之轉錄區，並沒有發生突變。然而，在 3 個細胞株中，可在 HONE-1 的 *FHIT* 發現 2 個點突變：Ser77Pro 及 Gln90Arg；CNE-1 的 *FHIT* 發現 1 個點突變，雖然 *FHIT* 點突變的生物效應未明，但到目前為止，很少有此種珍貴報告。至於從 *INK4a/ARF* 轉錄出的 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>*，則在 3 個細胞株都可發現於 intron 1 和 exon 2 交接處，出現 A→C 的點突變，後來經 RT-PCR 及序列分析，發現有捨接失誤，漏掉 exon 2，出現較短的 mRNA。

討

論

Bleomycin 是一族 glycopeptide 的抗生素，含有幾個相當少見的胺基酸及糖分子，和因種類而異的末梢胺基(Povirk, 1991)。它是一種混合物，臨床上使用的 bleomycin，包括 55-70% A2， 25-32% B2，及不多於 7% 的 A2'，1% B4 (Nippon Kayaku, 1991)。其細胞基因毒性效應類似放射線，當存在兩價鐵離子及氧氣時，可破壞 DNA，使胸腺嘧啶(thymine)游離出，或使 DNA 的骨架斷裂(Huet, 1985)。Kuo 及 Hsu 進一步發現 bleomycin 引起的染色質斷裂處，是在連接部(linker) (Kuo, 1978)。

Hsu 等(1989)發展以 bleomycin 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用於各種癌症病人及非癌症病人，發現大腸癌、頭頸部癌、肺癌及皮膚癌者，每個細胞的平均染色單體斷裂數比非癌症人高，有統計意義；但乳癌者和非癌症病人接近。他們的結果顯示細胞對基因突變劑的感受性，可能在和外界有直接交通之器官或系統的致癌過程，扮演重要的角色；而和外界沒直接交通之器官(如：乳腺)者較無關。

本研究之頭頸部癌症病人一樣比非癌症病人的平均斷裂數高，可以支持 Hsu 等之論點。Hsu 等之結果中，77 名頭頸部癌症病人及 335 名非癌症病人的每個細胞平均斷裂數，分別是  $1.03 \pm 0.51$  及  $0.60 \pm 0.35$ ，和本研究之  $1.03 \pm 0.45$ ， $1.30 \pm 0.45$ ， $1.35 \pm 0.44$  及  $0.80 \pm 0.32$  很接近。Li 及 Lin(1990)使用同樣的方法，但計算 100 個中期細胞，比較 fragile X syndrome 者和正常人之每個細胞的染色單體斷裂數，發現前者比後者高出很多，有統計上之意義，顯示對基因突變劑的感受性，可能和前者易伴隨癌症之現象有關。他們的結果顯示染色單體的斷裂數隨 bleomycin 的濃度及作用時間之增加而增加，當使用 bleomycin 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用 5 小時，所得的染色單體斷裂數最適中，較適合比較，本研究也有類似的結果。

另外 Cloos 等(1993)發現每樣本計算 100 個中期細胞較只計算 50 個細胞，所得結果的可靠性(reliability)和再現性(reproducibility)更為良好；而且間隔 3 個月後再重複抽同一個人的血，所得之結果的差異也低(標準差小於 10%)，這可見本分析法的可靠性及穩定性。

Bleomycin 試驗法的另外一個好處是，它可預測何種癌症病人，有最高的危險性出現第二個原發腫瘤，Schantz 等人(1990)蒐集 51 名平均染色單體斷裂數小於或等於 1.0，及 33 名平均染色單體斷裂數大於 1.0 的頭頸部癌症病人，經過長期的追蹤後，前者有 4 名(8%)出現第二個原發腫瘤，後者有 9 名(27%)出現第二個原發腫瘤( $p < 0.05$ )。另外，Wu 等人(1995)再加上 Giemsa 分帶術，發現肺癌的病人，除了有高的平均染色單體斷裂數之外，其斷裂所在的染色體並非隨機抽樣般，而是集中在特異染色體的特異區段，其中以第二、四、五、六對染色單體的斷裂數較多，這種特異的現象顯示，可能在第二、四、五、六對染色體，有重要的抑癌基因，因容易受到外來傷害，而失去作用，導致肺癌發生，是否如此，有待進一步的基因研究。

雖然本研究 LHC 病人的平均年齡，比其他三組的高( $p < 0.001$ )，但是以前的報告顯示(Cloos, 1993)，正常人或頭頸部癌症病人對誘變劑的感受性，並不受年齡、抽煙、喝酒等習性的影響：平均染色單體斷裂數和年齡( $r = 0.25$ ;  $p = 0.12$ )；抽煙的包-年數( $r = 0.22$ ;  $p = 0.17$ )；喝酒的杯-年數( $r = 0.23$ ;  $p = 0.16$ )都沒有相關。Cloos 等人(1993)對 5 名頭頸部癌症病人和 4 名正常人，在 1 到 12 週的間隔，重複抽血，測染色單體斷裂數的再現性，結果再現性很高，變動係數只有 8.9%。

本研究顯示三組頭頸部癌症病人比正常人都有較高的平均染色單體斷數，及較高比率的‘對 bleomycin 敏感’者，這些結果表示這三組頭頸部癌症病人，尤其是 ORC 及 LHC 者，對誘變劑有較高的感受性，推測與致癌相關。最近的報告指出抽煙中的致癌物質，如 benzpyrene，可選擇性地和  $p53$  基因產生強烈的親和，這和一般肺癌常在  $p53$  基因產生重大突變的情形一致(Denissenko, 1996)。假如某些人對抽煙中的致癌物質有較高的敏感性，一旦吸入這些致癌物質，將在呼吸道累積更多的基因傷害，而增加致癌的機會。Bleomycin 對淋巴球的毒性，類似一些毒物如 benzpyrene 對呼吸道的致癌效應。

本研究 ORC 及 LHC 者有很高的平均染色單體斷裂數，此發現和外在的致癌物質在上呼吸消化道癌症，扮演很重要的角色之事實相符合。NPC 病人則比 ORC 及 LHC 者有顯著低的平均染色單體斷裂數，也和外在的致癌物質在 NPC 的致癌過程，扮演較不重要的角色之事實相符合。但是 NPC 病人‘對 bleomycin 過度敏感’的勝算比是正常人的 3.6 倍，顯示對誘變劑的感受性的確在 NPC 的致癌過程，扮演著一定程度的角色，只是沒有 ORC 及 LHC 者顯著。

鼻咽癌是臺灣第二常見的頭頸部癌症，其致病原因是多重的，環境和遺傳因素都是重要的，在環境因素當中，食用廣東鹹魚和 EB 病毒的感染，是最常被提起的(Hildesheim, 1993)，以原位雜交法，利用 biotin 偵測到 81.7%的鼻咽癌組織有 EB 病毒的 DNA (Chen CL, 1993)。臨床上，有 8%的鼻咽癌病人出現家族簇集的現象(Hsieh, 1971)，華人的鼻咽癌患者有很高比率出現 HLA A2 及 Bw46 (Chan, 1983; Hammon, 1990)，以前對鼻咽癌切片標本及細胞株所做的細胞遺傳學研究，發現在第 3、9 對染色體的短臂有缺失，以限制酶片段長度多型性及使用微衛星多型標記，發現在第 3、9 對染色體的短臂(3p, 9p)、第十一對染色體的長臂(11q)有失異合性(LOH)的現象(Hu, 1996; Huang, 1994; Hui, 1996)。

鼻咽癌的生物習性和其他的頭頸部癌症不同，鼻咽癌對放射線很敏感，光用放射線治療便可達到很高的成功率(Hsu, 1982)，可是在其他的頭頸部癌症便不同了，鼻咽癌也比其他的頭頸部癌症有更高比率的遠隔轉移(Merino, 1977)。環境因素如抽菸、喝酒並非鼻咽癌的危險因素，但卻是其他頭頸部癌症的最危險因素；EB 病毒的血清抗體力價在鼻咽癌病人相當高，可是在其他的頭頸部癌症普遍卻不高(Hsu, 1974)；遠隔轉移很容易出現於鼻咽癌病人，但是其他頭頸部癌症卻少有遠隔轉移；鼻咽癌容易出現於特定種族與特殊的地理分布，顯示遺傳和環境因素在鼻咽癌致病過程，扮演相當重要的角色，在美國出生的華人比同年齡層的華人移民，有較低的鼻咽癌致病率，強烈支持環境因素的重要性(Zippen, 1962)；可是另一方面，在不同國家、不同環境下生活的華人移民，仍然比當地非華人民族有特別高的鼻咽癌致病率，以及居住環境和華人民族截然不同的北非民族，仍然有很高的鼻咽癌致病率，亦強烈顯示遺傳基因在鼻咽癌致病過程所佔角色的重要性(Betuel, 1975)。這些證據支持本研究：NPC 的平均染色單體斷裂數比對照組者高，但均低於 ORC、LHC 者，也是都有統計學上意義。的確，環境因素在鼻咽癌致病過程，有其一定的角色，但沒有在其他的頭頸部癌症那樣重要。

雖然大量的抽煙、喝酒和鼻咽癌的發生有點相關，但勝算比並沒有達到統計意義，所以抽煙、喝酒對鼻咽癌的致病危險性沒有顯著效應；而且吃鹹魚在廣東、香港以外的地區並不普遍，這些證據也支持本研究的結果。遺傳基因因素在鼻咽癌的致病過程，是最重要的，也是亟待進一步研究的。

植物血凝素除了有使紅血球凝集的能力外，尚可刺激淋巴球進行有絲分裂，可作為一種細胞免疫能力的測定法。利用此方法，Hsu 等(1980)發現鼻咽癌病人對植物血凝素的反應比正常人差( $p < 0.01$ )，而且依賴抗體的細胞性毒殺能力也比正常人差(Pearson, 1978, 1984)。此外鼻咽癌病人血中的可溶性 IL-2 受器比正常人高出很多( $p = 0.003$ )，因該可溶性受器可作為 IL-2 的功能阻斷劑，而中和了 IL-2 的作用，所以降低了植物血凝素對淋巴球的促有絲分裂反應(Hsu, 1991, 1995)。

本研究在其他頭頸部癌症病人，也得到類似的結果。不論加不加藥，非癌症病人的有絲分裂指數，皆比癌症病人高，且有統計上之意義。而有一些癌症病人甚至找不到足夠的中期細胞，顯示頭頸部癌症病人的細胞免疫能力，比非癌症病人差。咖啡因對齧齒類動物的細胞培養不會引起點突變(point mutation)，但可引起染色體斷裂，增加很多化學、基因突變劑引起的斷裂。咖啡因可抑制修補 DNA 的作用，可縮短正常細胞因放射線引起的 G2 期之延長，表示咖啡因可抑制被放射線破壞之 DNA 的修補(Kihlman, 1973; Sabatier, 1988; Legator, 1979)。本研究加入 bleomycin 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  所引起的每個細胞平均染色單體斷裂數，在口腔癌或口咽癌、喉癌或下咽癌的病人，與非癌症病人之間有顯著差異。這間接反應出該癌症病人的 DNA 修復能力，比非癌症病人有顯著的降低。因此以 bleomycin 測驗法，可得知對環境致癌物質的感受性，有助於篩選出會引起頭頸部癌症的高危險群。

鼻咽癌經 CGH 實驗後，發現主要有以下的變化：基因增加出現於染色體 12p(59%)，1q(47%)，17q(47%)，近中央節的 11q(41%)，12q(35%)，9q(24%)及 8(24%)；基因缺失的有染色體 3p(53%)，9p(41%)，13q(41%)，14q(35%)，靠遠端的 11q(29%)，5q(25%)及 16q(19%)。比較台灣和香港鼻咽癌的結果，發現兩者最主要的差異是，前者 9q 的基因增加較多，沒有基因減少的情形；11q，17q 基因增加的情形較多。而後者 9q 少有基因增加的情形，卻高達 60%(12/20) 有基因缺失；11q，17q 少有基因增加，反而是 19，20 有較多基因的增加。可見兩地鼻咽癌的基因變化還是有差異，雖同是華裔，還是有不同點。共同點是 1q，8，12 有基因增加；3p，9p，11q，13q，14q 有基因缺失(Chen, 1999; Hui, 1999)。而且相同的基因缺失也出現在其他的癌症(Kallioniemi, 1995; Gronwald 1997; Schwendel 1997)。

重要的是，有基因缺失的染色體目前已知有很多抑癌基因(Li, 1997; Hahn, 1996)，如 9p21 有 *MTS1*(multiple tumor suppressor 1)/*p16* 和 *MTS2* 基因(Gonzalez, 1997)；11q21-23 有 *ATM* 基因(Hui, 1996)；3p14.2 有 *FHIT*(fragile histidine triad) (Ohta, 1996; Negrini, 1996; Virgilio, 1996)；5q21 有 *APC* (Jessup, 1992)；16q22.1 有 E-cadherin 基因。但 3q12 的 *BRCA2* 及 13q14 的 *RBI*，並不在鼻咽癌 13q21-32 的缺失處；*p53* 所在的 17p13，在鼻咽癌也沒有缺失，這和絕大部分的報告，鼻咽癌並沒有 *RB* 及 *p53* 基因的突變或其他變化相符合。另外利用 PCR-single strand conformational polymorphism (SSCP)及序列分析，發現 *p53* 基因作用過程的下游基因 *p21*，又名 *WAF-1* 及 *CIP-1*，也沒有點突變的現象，顯示 *RB* 及 *p53* 基因的去活化，在鼻咽癌的致病過程並不重要(Sun, 1995b)。

有基因增加的染色體有致癌基因的有：11q13 的 *CCND1* (cyclin D1)和 *INT2*；2p12.1 有 *RASK* (Porter, 1994)；12p13 有 *CCND2* 和 *TEL*；12p 有 *PTHLH* (parathyroid hormone-related polypeptide)；12q 有 *CDK4*、*INT1*、*MDM2*；8q24 有 *c-MYC* (Porter, 1994)等一些致癌基因，這些基因的過度表現可能參與鼻咽癌的形成。另外，17q21-q25 的基因增加也出現在小腸型的胃癌、神經母細胞瘤、神經纖維瘤(Lothe, 1996; kokkola, 1997; Plantaz, 1997)。以前實質腫瘤的 CGH 報告也常見 1q 的基因增加(Forozan 1997; Knuutila, 1998)。基因增加出現在 12p 也常見於乳房腫瘤、睪丸胚母細胞瘤、胰臟瘤及白血病 (Ried, 1995; Mostert, 1996; Mahlamaki, 1997, Willem, 1997)。

PE/ABI 製造的微衛星多形標記之間距約為 10 centimorgan (cM) (Perkin/Elmer, 1997)，在人類 23 個染色體的基因大小約 3300 cM，共有約 30 億鹼基對，所以 1 cM 約有  $10^6$  鹼基對；如果用 Giemsa 染色分帶術(Giemsa banding)可分出 400 段，平均每段有  $7.5 \times 10^6$  鹼基對(Watson, 1992)，一個微衛星多形標記有失異合性，最長可有  $2 \times 10^7$  鹼基對缺失，要在如此大的缺失段中找到可能的抑癌基因，並非易事。必須尋找間距更短的微衛星多形標記，以縮短含抑癌基因之片段，以免像在稻草堆中找針。文獻上目前有關各種癌症失異合性的報告大都是使用附有同位素的標記，比較不方便及費時，且客觀性較差。

使用 PE/ABI 附螢光的標記可同時將相同長度，不同螢光的標記產物，放入同一行進行電泳，以電腦記錄標記大小及面積，比較省時又客觀，適宜大規模研究，只是費用較高。做失異合性的實驗，最怕在癌組織內有太多正常細胞的污染，但癌組織中常有淋巴球浸潤或殘存一些正常細胞，即使在顯微鏡下分離，有時也難免會有正常細胞的污染。加上聚合酵素鏈反應的增大，難免會有些正常去氧核糖核酸作為模版所複製出的產物，而掩蓋癌細胞去氧核糖核酸失去該片段之事實，因此對於失異合性的判斷標準定為兩尖峰圖形有一個不見，或癌細胞的標記產物和正常細胞的標記產物尖峰面積比值小於或等於 0.5(van der Riet, 1994)。有時為了避免偵測誤差，必須考慮癌細胞和正常細胞之兩等位基因尖峰的面積比，而將失異合性的條件定為  $(T1/T2)/(N1/N2) < 0.50$ ，如果數值大於 1，便取倒數，其中 T1，N1 分別表示癌細胞、正常細胞之較短等位基因的尖峰面積；T2，N2 分別表示癌細胞、正常細胞之較長等位基因的尖峰面積(Magnusson, 1996)。

雖然微衛星多形標記實在太多了，文獻上所使用的標記大多數不一樣，但 Giemsa 染色分帶術的一段有  $7.5 \times 10^6$  鹼基對，包含許許多多的微衛星多形標記，可使用此種細胞遺傳學的術語進行溝通。有報告指出部份頭頸部癌在 3p25.1 有失異合性(Rowley, 1996)；部份乳癌在 11q13 有失異合性(Zhuang, 1995)；部份間皮瘤在 3p25-3p11 有失異合性(Zeiger, 1994)；部份鼻咽癌在 3p14，3p14.2-3p14.1，3p21.1-3p14.3，11q13.3-22 及 11q22-24 有失異合性(Huang 1991, 1994; Hu, 1996; Hui, 1996)，表示在上述染色體區段可能存在抑癌基因，因缺失而導致癌症發生。



由於抑癌基因的去活化最常見於，一等位基因的缺失加另一等位基因的點突變。為了進一步了解鼻咽癌細胞染色體上更小區段的缺失，借助看 LOH 的情形，可得知更詳細、更精確的基因缺失現象。因為每對同源染色體當中，一條來自父親，一條來自母親，其中有很多多形標記，可區分何者來自父親，何者來自母親，所以有異合性(heterozygosity)。以前利用有多形性，含有許多重複序列的微衛星標記(microsatellite marker)，附上放射性同位素於引子，經 PCR、電泳、曝光，比較正常細胞和癌細胞的多形標記，如果癌細胞有一條標記不見了，或是含量是正常細胞的一半以下，謂之有 LOH，表示該標記所在染色體區段附近，可能有重要的抑癌基因，因細胞失去該基因，加上另一等位基因有點突變而致癌。由於使用同位素較麻煩、費時，所以斷斷續續出現報告，指出鼻咽癌在第 3，9，11，13，14 對染色體有 LOH (Huang, 1991, 1994; Hui, 1996; Cheng, 1997)，尤其 9p21-22 有純合性缺失(homozygous deletion)。後來有附上不同顏色的螢光標記(Cawkwell, 1993)，藉助電腦化，可以安全又快速處理龐大資料，所以可以做全基因組的失異合性定位，利用含有三種螢光之一，分布於 23 對染色體上的 382 個微衛星標記，進行複合式 PCR (multiplex PCR)，一支反應試管可放入多個標記的引子，電泳時同一電泳槽可放入同長度、不同顏色，或不同長度、同顏色的標記，經雷射激光，電腦記錄、判讀，可比傳統同位素法快上幾十倍，但是利用雙核甘酸重覆序列的微衛星多形標記，來看失異合性之 informative rate (可分辨出兩尖峰之多形性的比率)並不很高，約 50%，效率打折扣。以 informative rate 較高的四核甘酸重覆序列的多形標記，進行失異合性的定位，效率較好，比較不會作虛功。結果發現鼻咽癌失異合性的比率依次是：3p(96.3%)，9q(88.9%)，9p(85.2%)，14q(85.2%)，11q(74.1%)，12q(70.4%)，13q(55.6%)，16q(55.6%)，5q(44.4%)，12p(44.4%)，1p(37.0%)，表示位於上述染色體之抑癌基因的去活化，在鼻咽癌的致癌過程，扮演相當關鍵的角色(Lo, 2000)。

因為使用 CGH 或看 LOH，鼻咽癌細胞 3p, 9p 的缺失都很常見，尤其 9p21-22 有純合性缺失，表示該區段的抑癌基因在鼻咽癌的致癌過程是很常見及最關鍵的，因此位於 9p21 的 *p16* 基因變成為熱門研究重點 (Okamoto, 1994)。*p16* 基因又名 multiple tumor suppressor 1(*MTS1*) 基因，或 cyclin D kinase 2(*CDKN2*) 基因，可轉譯出 p16 蛋白質，抑制 cdk4/cyclin D 複合體的催化活性，抑制細胞週期(Lo, 1995)。以 PCR-SSCP 加序列分析 20 個鼻咽癌切片檢體，3 株異種移植株及 3 株細胞株 (HK-1, CNE-1, CNE-2)，結果發現在前兩者都沒有 *p16* 的點突變，只在 HK-1 *p16* 基因 exon 2 之撿接處的第一個鹼基發生 G→A 的 transition；在 CNE-1, CNE-2 相同位置的第二個鹼基發生 A→C 的 transversion，結果導致 mRNA 撿接失誤，漏掉 exon 2 而出現異常、較短的 mRNA (Lo, 1995)。在原發鼻咽癌切片檢體雖然有正常細胞的干擾，但使用敏感的 PCR-SSCP 方法，只要有 10% 的細胞有點突變，便可偵測出，因此即使沒有使用不受正常細胞污染的純癌細胞作實驗，仍可確定原發鼻咽癌沒有 *p16* 的點突變，但是以 Northern blot 在 HONE-T1 細胞株及裸鼠身上的鼻咽癌腫瘤(C15)，卻只偵測到很少量的 p16 mRNA，表示 *p16* 雖然沒有點突變，可是因為有其他的後成的因素(epigenetic factor)，導致正常的 p16 mRNA 減少或缺失。進一步以對甲基化沒有作用的限制酶，如 Sma I 或 Sac II 切 DNA，如果 *p16* 基因的 5' CpG island 有甲基化，則會切出較長的片段，由電泳得知原發鼻咽癌 *p16* 基因的 5' CpG island 有 22%(6/27) 出現甲基化，表示甲基化這種後成的因素，導致 *p16* 基因不能表現功用，而形成原發鼻咽癌(Lo, 1996)。如果將正常的 *p16* 基因轉染(transfect)到缺乏 *p16* 基因的細胞株 NPC/HK-1，則可發現該細胞株的生長受到 70% 以上的抑制。

至於 3p 上的抑癌基因，和鼻咽癌比較有關的是位於 3p14.2 的 *FHIT* (fragile histidine triad) (Ohta, 1996) 和 3p25 的 *VHL* (von Hippel Lindau) 基因，但目前少有鼻咽癌和 *FHIT*, *VHL* 之關係的研究。本報告在三個細胞株中，可在 HONE-1 的 *FHIT* 發現兩個點突變：Ser77Pro 及 Gln90Arg；CNE-1 的 *FHIT* 發現一個點突變，為 CAG → CAA，但是沒有發生胺基酸的變化，雖然 *FHIT* 點突變的生物效應未明，但是一個胺基酸的變化可導致整條蛋白質的變性，而產生重要的變化，到目前為止，很少有此種珍貴報告。反倒是利用微小細胞融合法 (microcell fusion)，將具有不同缺失區段的第三個染色體，融入 HONE-1 鼻咽癌細胞株，再種到裸鼠，看 HONE-1 形成腫瘤的能力，結果發現只要存在 3p21.3 的區段，便可有抑制腫瘤形成的能力，顯示 3p21.3 有抑癌基因，可抑制 HONE-1 的增生能力 (Cheng, 1998)。

本研究在染色體 3、9、11 上，共使用特定位置的 133 個附有螢光物質的微衛星多形標記引子 (50 對為雙核甘酸重覆序列的多形標記；9 對為三核甘酸重覆序列的多形標記；74 對為四核甘酸重覆序列的多形標記)，平均間隔約 4 cM，只有七個多形標記的間隔是介於 10-15 cM 之間，算是比較密集的，也有助於定位缺失的區段。三核甘酸重覆序列的多形標記，或四核甘酸重覆序列的多形標記，在電腦上的圖形比較清楚，不像二核甘酸重覆序列的多形標記會出現 stutter band，比較好判讀。本研究雖然沒有使用顯微鏡下剝離出的鼻咽癌細胞，但是在這些染色體上出現 LOH 的頻率，和使用顯微鏡下剝離出的鼻咽癌細胞者的結果是類似的 (Lo, 2000)，甚至有八個新發現常見 (26%-52%) 的缺失段位於 3p25.2-25.1, 3q22.1-23, 3q26.2-27.1, 3q29, 9q21.32-22.2, 9q34.12-34.3, 11p15.5-15.4 及 11q24.3-25，只因本研究使用高密度的多形標記，而可發現不顯著但卻是在很多檢體都有出現的缺失區段，而且幾個常見的缺失段也出現於以前報告過的其他癌症 (Kok, 1997; Rasio, 1995; Simoneau, 1999)。染色體 3、9、11 上可能存在抑癌基因的假說，也可以由將個別 3、9、11 染色體轉染到各種癌細胞，而可抑制腫瘤生長的事實得到支持 (Cheng, 1998, 2000; Rimessi, 1994; Satoh, 1993; Uzawa, 1995)。

為了能夠以分子生物學的方法早期診斷及預測鼻咽癌的預後，本研究以統計方法分析等位基因缺失與臨床病理變數的相關性，結果顯示標記 D3S3039 所在的 3p14.3-13 之等位基因缺失和早期的鼻咽癌有顯著相關性( $p=0.022$ ) (資料未列出)，此結果有待進一步更深入研究，雖然分子機轉未明，但是蒐集更多以顯微鏡下剝離出的鼻咽癌細胞，分析標記 D3S3039 的 LOH，將有助於鼻咽癌的早期診斷，有趣的是，3p14 的染色體缺失也常見於很多種癌症，而且與致癌過程的早期相關 (Velickovic, 1999; Hung, 1995; Huebner, 1998)；標記 D9S318、D11S1304 分別所在的 9q21.3-22.21、1q24.3-25 之等位基因缺失和 N2/N3 有顯著相關性( $p=0.035$ 、 $p=0.005$ )；標記 D9S905、D11S1304 分別所在的 9q34.1-34.3、11q24.3-25 之等位基因缺失和晚期的鼻咽癌有顯著相關性( $p=0.022$ 、 $p=0.017$ )，有趣的是，這些染色體缺失也常見於很多種癌症，而且與致癌過程的晚期相關 (Minobe, 1998; Gabra, 1996; Evans, 1998; Launonen, 1998; Winqvist, 1995)，同樣地，這些結果有待進一步更深入研究，蒐集更多以顯微鏡下剝離出的鼻咽癌細胞，分析標記 D9S318、D11S1304、D9S905 及 D11S1304 的 LOH，將有助於預測鼻咽癌的預後。

一樣有趣的是，最近的報告顯示 9q22-23、11q24.3-25 之等位基因缺失，和晚期的卵巢癌 (Gabra, 1996; Launonen, 1998)、乳癌 (Minobe, 1998; Winqvist, 1995)、子宮頸 (Evans, 1998) 癌也有顯著相關性。這種顯著相關性指出，在這些缺失區段 (9q22-23、11q24.3-25) 可能存在抑癌基因，因缺失而導致鼻咽癌及卵巢癌、乳癌、子宮頸癌容易增生、侵犯、淋巴結以及遠隔轉移。的確，在 9q22.3 含有一個抑癌基因 *PTC*，該基因是果蠅 *patched (ptc)* 基因的相似物，可轉譯一個橫跨細胞膜的蛋白質，壓抑轉譯出 TGF- $\beta$  及 Wnt 族蛋白質之基因的轉錄 (Johnson, 1996)，雖然 Wnt 族蛋白質可減少細胞間的黏合，而導致癌症的侵襲，但 *PTC* 基因的缺失與鼻咽癌的轉移及晚期發展之關係，仍需進一步研究。最近的報告發現在 11q24-25 有一個人類 homeobox 基因 *BARX2*，可引發 *cadherin 6* 的表現，抑制卵巢癌的惡化 (Sellar, 2001)，人類 *BARX2* 和 *cadherin 6* 基因的表現在卵巢癌的細胞株和組織之中非常低，將 *BARX2* 轉染到缺少該基因的細胞株 (OAW42)，可抑制 Matrigel invasion、haptotactic cellular migration to a collagen IV signal、及抑制黏附到塗有 collagen IV 的板上。*BARX2* 蛋白質 (含 254 個胺基酸) 和果蠅 *BAR* 族蛋白質是相似物，可調節細胞黏附分子及抑鈣激素等基因的轉錄，避免腫瘤的惡化 (Edelman, 2000)，晚期鼻咽癌與 *BARX2* 和 *cadherin 6* 基因的抑制，將是值得研究的話題。另外，D9S905 所在的 9q34 之基因缺失也常見於膀胱癌 (Habuchi, 1995)，及其他系列的晚期鼻咽癌 (Shao, 2000)，在 9q34 有一個抑癌基因 *TSC1*，其突變基因出現於 tuberous sclerosis 病 (van Slegtenhorst, 1997)，*TSC1* 在大鼠纖維母細胞的過度表現可抑制其細胞週期，而作為腫瘤的壓抑劑 (Benvenuto, 2000)，因為仍未知 *TSC1* 和癌症的晚期是否相關，進一步研究 *TSC1* 及其他位於 9q34 的可能抑癌基因之功能，將有助於了解晚期鼻咽癌的成因。

本研究使用高密度、距離接近的多形標記，將 LOH 的區段盡量縮短，有助於抑癌基因的定位解碼，吾人發現最小的缺失區段在 3p25.3-24.1，3p23-21.23，11q22.1-23.2，其中位於 3p25.3-24.1，3p23-21.23 的抑癌基因有 *VHL*、*MLH1*、*TGFBR2*、*CTNBN1*，至少有有三個候選抑癌基因，包括 *ATM*、*PPP2R1B*、*ST3* 位於 11q22.1-23.2，我們的結果不僅佐證 3p、11q 上有常見的等位基因缺失，而且可以加速對這些候選抑癌基因的定位解碼。

因為使用 CGH 或看 LOH，鼻咽癌細胞 3p，9p 的缺失都很常見，尤其 9p21-22 有純合性缺失，表示該區段的抑癌基因在鼻咽癌的致癌過程是很常見及最關鍵的，因此位於 9p21 的 *p16* 基因變成為熱門研究重點。*p16* 基因又名 multiple tumor suppressor 1 (*MTS1*) 基因，或 cyclin D kinase 2 (*CDKN2*) 基因，可轉譯出 p16 蛋白質，抑制 cdk4/cyclin D 複合體的催化活性，抑制細胞週期。雖然 *FHIT* 所在的 3p14.3-13 之等位基因缺失和早期的鼻咽癌有顯著相關性，但是從 21 個鼻咽癌組織的 *FHIT*、*p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 之轉錄區，並沒有發生突變(資料未列出)。然而，在三個細胞株中，可在 HONE-1 的 *FHIT* 發現兩個點突變：Ser77Pro 及 Gln90Arg；CNE-1 的 *FHIT* 發現一個點突變。位於 3p14.2 的 *FHIT* 是從一個與遺傳性腎細胞癌相伴的 t(3;8)(p14.2;q24) 轉位發現的(Ohta, 1996)，之後，在許多癌症常發現有 *FHIT* 的缺失、異常的轉譯、及 *FHIT* 蛋白質的減少或缺失(Huebner, 1998)。最近發現異合子 *FHIT*(+/-) 的小鼠，在給予致癌物後，會出現多個腫瘤(Fong, 2000)，這些證據強烈支持 *FHIT* 是一個抑癌基因，*Fragile Histidine Triad (FHIT)* 所在的 3p14.2，該基因橫跨最易受誘發的脆弱點 FRA3B，該脆弱點包括一大段 DNA，可能大於 600 kb(Zimonjic, 1997)，其中含有少量的 *Alu* 重複序列，但是富含約 1 kb 的 long interspersed nuclear element 1 (LINE 1) 重複序列(Inoue, 1997; Boldog, 1997)，由 5' 端到 3' 端，依序有 t(3;8)(p14.2;q24) 轉位點、HPV 16 嵌入點、雜交斷裂點(hybrid breaks) 及 pSV2neo 嵌入點(Croce, 1999)。染色體的脆弱點易造成基因的不穩定，染色體斷裂及結構的重組而致癌，*FHIT* 包括 10 段 exon，散在大約 1 Mb 的 DNA 上，可轉錄出 1.1 Kb 的 mRNA，轉譯區包括 exon 5 到 9，可轉譯出 16.8 kD 的蛋白質，帶有 diadenosine triphosphate (Ap3A) hydrolase 的活性，可將 Ap3A 分解成 adenosine 5'-diphosphate 和 AMP (Ohta, 1996; Barnes, 1996)，Fhit 蛋白質由 147 個胺基酸組成，其中由 exon 8 轉譯出的胺基酸，含有很多生物都保存的相同之三個 histidine (H×H×H，第 94, 96, 98 個胺基酸)，該 histidine triad 是鋅的結合區(Ohta, 1996)。儘管最近的報告指出 Fhit 蛋白質可代謝細胞內的 Ap3A，而不影響 Ap4A 的濃度，Ap3A 和 Ap4A 可能是哺乳類細胞為了適應環境壓力，如熱，氧化及 DNA 受到破壞，參與細胞內及細胞外的兩個訊息傳遞分子(Murphy, 2000)，*FHIT* 的過度表現可引起凋亡及抑制癌症，在在說明 *FHIT* 是一個很重要的抑癌基因，*FHIT* 的變化常出現於腫瘤形成的早期，如分化不良處或原位癌，特別是和外在致癌物質相關的癌症，如肺癌(Croce, 1999)，在抽菸者的肺腺癌，因香菸的致癌物和 FRA3B 作用的結果，在 *FHIT* 區段常可見 LOH，而且抽菸的時間越久及接觸石棉，更易有 *FHIT* 缺失(Tseng, 1999)，*FHIT* 缺失也是肺癌的一個不好預後因子(Burke, 1998)。此外，有 HPV 感染的子宮頸癌，可促進 FRA3B 的斷裂，而出現 3p 的 LOH，可導致 *FHIT* 的去活化(Muller, 1998)。最重要的發現是外來的 DNA 如 pSV2neo，很容易嵌入經 aphidicolin (DNA polymerase  $\alpha$  的抑制劑) 處理過的培養細胞之 FRA3B，而導致 *FHIT* 的不穩定(Rassool, 1992)，因此有人推測接觸外在致癌物質後，可能 EBV 經由嵌入到 FRA3B 區域，而加速鼻咽癌的形成(Croce, 1999)，這種推測符合流行病學的研究結果，即鼻咽癌和外在致癌物質及 EBV 都有關聯。最近的報告指出，蒐集 28 個鼻咽癌細胞超過 70% 的切片檢體，及 16 個非癌症的鼻咽黏膜檢體，經萃取 RNA 後，以反轉錄酶取得 cDNA，再經 nested PCR 取得 *FHIT* 的 DNA 產物，以電泳分開不同長度的片段，再切下膠片的 DNA 進行序列分析，結果 16 個正常的鼻咽組織只有 707 bp 的正常 *FHIT* 轉錄產物，不同長度的不正常 *FHIT* mRNA 存在 42.9%(12/28) 的鼻咽癌檢體，其中 11 個有較短，1 個有較長的 mRNA。序列分析發現最短的 mRNA 缺少 exon 4 到 7，有的缺少 1 或 2 或 3 個 exon，或再加上不

同長度的外來 DNA 之插入(Deng, 2001) , 這些不同長度的外來 DNA 是否屬於 EBV, 值得進一步研究。

$p16^{INK4a}$  可以抑制 cdk4/6, 在有正常的 *RB* 基因存在的細胞中, 可以阻斷細胞週期由 G1 進入 S 期 (Kamb, 1994);  $p19^{ARF}$  和  $p16^{INK4a}$  是 alternative splicing 之後的產物, 兩基因共用 exon 2, 前者由 exon 1 $\beta$  splice 而成(Alternative Reading Frame); 後者由 exon 1 $\alpha$  splice 而成。 $p19^{ARF}$  可以引起細胞週期的停止及凋亡, 在有正常的 *p53* 基因存在的細胞中, 可以抑制 *myc/ras* 的變形。雖然有報告指出, 在很多種癌細胞株沒有  $p16^{INK4a}$  的點突變, 但可發現有同合子缺失, 以及過甲基化而使轉錄失靈(Sun, 1995; Gulley, 1998; Lo, 1995; Ruas, 1998)。

因為  $p19^{ARF}$  在鼻咽癌的角色未明, 為了明瞭  $p16^{INK4}$  及  $p19^{ARF}$  在鼻咽癌致病過程中的重要性, 我們做了突變篩選, 結果和以前報告的來自軟骨肉瘤之細胞株 (HTB-94) 的點突變一模一樣(Lo, 1995; Liu, 1995), 雖然本報告的三個細胞株在 *INK4a/ARF* 有相同的點突變, 但是它們的來源不同, 細胞型態也不同, HONE-1 是分化不好的上皮細胞癌, CNE-1 及 CNE-2 是分化較好的上皮細胞癌, 還有三個細胞株的 *FHIT* 基因型態也不同, 所以其來源是不同的, 可是以四個不同數目的重複序列(VNTR)之標記, 發現經電泳後得到幾乎相同長度的片段, 反而傾向是同一來源。可能需要分析其染色體及 HLA, 才能釐清這三個細胞株的來源。

至於從 *INK4a/ARF* 轉錄出的  $p16^{INK4a}$  和  $p19^{ARF}$ , 則在三個細胞株都可發現於 intron 1 和 exon 2 交接處, 出現 A $\rightarrow$ C 的點突變, 後來經 RT-PCR 及序列分析, 發現有捨接失誤, 漏掉 exon 2, 出現較短的 mRNA。我們的序列分析發現漏掉 exon 2 的較短 mRNA, 將轉譯出截然不同的  $p16^{INK4a}$  和  $p19^{ARF}$  的蛋白質, 前者的轉錄子是由 exon 1 $\alpha$  直接接到 exon 3, 預測會轉譯出包括前 50 個正常的胺基酸, 和 39 個由 exon 3 轉譯出不同的胺基酸; 後者的轉錄子是由 exon 1 $\beta$  直接接到 exon 3, 可能會轉譯出包括前 64 個正常的胺基酸, 和 4 個由 exon 3 轉譯出不同的胺基酸。

經西方墨點法分析, 以對抗人類  $p16^{INK4a}$  和  $p19^{ARF}$  的蛋白質之抗體, 可偵測到對照組的 HeLa 細胞有訊號, 但無法偵測到這三個細胞株者(資料未列出), 可能這些突變的蛋白質沒被轉譯出, 或不穩定, 或立體結構改變, 而無法被抗體偵測到(Gulley, 1998)。

展

望

由於 Bleomycin 試驗法可以反應出對誘變劑的感受性，可以挑出對外來致癌物質比較敏感的高危險群，因此可以作為篩選非鼻咽癌之頭頸部癌症的一種工具，另外一個好處是，它可預測那些癌症病人，有最高的危險性出現第二個原發腫瘤，對 bleomycin 過度敏感者比不敏感者有較高比率(27% vs 8%)，出現第二個原發腫瘤，因此在長期的追蹤過程中，可以提醒醫師對這些過度敏感者提高警覺，以期早點發現第二個原發腫瘤，及早治療，增加治癒的機會。

本研究口腔口咽癌及喉下咽癌者有很高的平均染色單體斷裂數，此發現和外來的致癌物質在上呼吸消化道癌症，扮演很重要的角色之事實相符合。鼻咽癌病人則比口腔口咽癌及喉下咽癌者有顯著低的平均染色單體斷裂數，也和外來的致癌物質在鼻咽癌的致癌過程，扮演較不重要的角色之事實相符合。但是鼻咽癌病人‘對 bleomycin 過度敏感’的勝算比是正常人的 3.6 倍，顯示對誘變劑的感受性的確在鼻咽癌的致癌過程，扮演著一定程度的角色，只是沒有口腔口咽癌及喉下咽癌者顯著。

至於加上 Giemsa 分帶術，發現肺癌的病人，除了有高的平均染色單體斷裂數之外，其斷裂所在的染色體並非隨機抽樣般，而是集中在特異染色體的特異區段，其中以第 2、4、5、6 對染色單體的斷裂數較多，這種特異的現象值得進一步在頭頸部癌症深入研究，找出那些特異染色體的特異區段，比較容易出現斷裂，對照已知的基因體資料庫，嘗試找出相關受破壞的基因，進一步研究是否一樣容易受到其他誘變劑破壞，接著便可再了解該基因受破壞後的生物效應，如此對解開致癌之謎將有突破性的進展。

但是以 Giemsa 分帶術來分辨染色單體斷裂，位於那些特異染色體的那些特異區段，非常費時，必須將每個細胞中期照相，剪貼分類，每一個病人至少要照 50 張相片，如果有 140 名病人，則要 7000 張相片，而且需要有經驗的技術人員來做分類，才不會造成錯誤，因此藉助電腦及螢光技術，配合人類基因組的解密，才容易對基礎研究作出貢獻。未來可利用光譜染色體組型分析(Spectral Karyotyping, SKY)，使用 24 種不同螢光顏色，‘塗抹’在染色體上，使得一次實驗可看到所有染色體的技術，來看染色單體的斷裂以及染色體的斷裂或重組(如：移位)，如此便可輕易看出那些染色體的染色單體發生斷裂。細胞必須經過培養，固定在染色體中期，然後以各種染色探針，經 PCR 標記在各染色體上，每個檢體至少觀察 50 個中期細胞。SKY 和 CGH 一樣，在一次實驗可看到癌症的基因病變全貌，SKY 可以取代傳統的 karyotyping，省掉照相、剪貼的費時麻煩，以及必須經驗豐富才能分辨染色體的困擾，對於辨識染色體的斷裂點很有幫助，有助找出染色體的脆弱點，對照已知的人類基因組資料庫，找出與欲研究之癌症相關的抑癌基因和致癌基因(Singh, 2001)。



本研究以 CGH 得知 NPC 所有染色體基因的增減情形，總共有 131 個染色體變化(50 個缺失；81 個增加)出現於 17 個原發腫瘤中；有 118 個染色體變化(48 個缺失；70 個增加)出現於 19 個復發腫瘤中。原發腫瘤最常見的基因增加，位於 12p (59%)；而復發腫瘤最常見的基因增加，位於 11q (53%)。原發腫瘤在 12q、9p、11q、14q 出現染色體變化的比率，反而遠比復發腫瘤者高( $p < 0.05$ )。第 II 期原發腫瘤的平均染色體缺失有 0.8 個，平均染色體增加有 3.8 個；第 III、IV 期的平均染色體缺失各別有 4.0、3.8 個，平均染色體增加各別有 7.7、4.3 個( $p < 0.05$ )。

由於本研究發現復發腫瘤的基因增加及缺失，並不比原發腫瘤者多，顯然復發的原因並不是該腫瘤有更嚴重的基因變化。由於原發腫瘤的治療是以放射線為主及注射抗癌藥物為輔，如果檢討放射線治療的過程有人為的誤差，如影像檢查沒有完全顯示腫瘤的範圍，或放射線治療的範圍沒有涵蓋所有的腫瘤，則復發的原因可能就是人為的疏忽，注射抗癌藥物只要劑量沒算錯，藥物沒注射錯誤，定期定量注射，較不會有人為的疏忽，如果整個治療過程沒有人為的誤差，可能腫瘤對放射線及注射抗癌藥物有抵抗性，表示對放射線不敏感的問題，並不是決定在基因層次，可能腫瘤的血液循環不好，沒有足夠的氧氣被放射線形成自由基來破壞腫瘤的 DNA，或腫瘤細胞修補被破壞的 DNA 之能力特別強等等。另外一個原因是 CGH 不夠敏感，無法偵測出很小區段的基因缺失，不能顯現復發腫瘤的所有基因缺失。

鼻咽癌經 CGH 實驗後，發現主要有以下的變化：基因增加出現於染色體 12p(59%)，1q(47%)，17q(47%)，近中央節的 11q(41%)，12q(35%)，9q(24%)及 8(24%)；基因缺失的有染色體 3p(53%)，9p(41%)，13q(41%)，14q(35%)，靠遠端的 11q(29%)，5q(25%)及 16q(19%)。由於 CGH 在一次實驗，可得知癌症所有染色體基因的增減情形，是癌症研究的第一步，因此要解開台灣人鼻咽癌的致癌之謎，首先要研究位於染色體 12p，1q，17q，近中央節的 11q，12q，9q 及 8 有那些致癌基因參與致癌過程；位於染色體 3p，9p，13q，14q，靠遠端的 11q，5q 及 16q 有那些抑癌基因參與致癌過程，如此可以縮小研究範圍，節省時間。

重要的是，有基因缺失的染色體目前已知有很多抑癌基因，如 9p21 有 *MTS1*(multiple tumor suppressor 1)/*p16* 和 *MTS2* 基因；11q21-23 有 *ATM* 基因；3p14.2 有 *FHIT*(fragile histidine triad)；5q21 有 *APC*；16q22.1 有 E-cadherin 基因。但 3q12 的 *BRCA2* 及 13q14 的 *RBI*，並不在鼻咽癌 13q21-32 的缺失處；*p53* 所在的 17p13，在鼻咽癌也沒有缺失，這和絕大部分的報告，鼻咽癌並沒有 *RB* 及 *p53* 基因的突變或其他變化相符合，經 CGH 實驗後，發現基因增加之最小的重疊區段在 12p12-13，1q21-22，17q21，17q25，11q13 及 12q13；基因缺失的最小的重疊區段在 3p12-14，3p25-26，9p21-23，13q21-32，14q12-21 及 11q14-23，表示位於上述較小染色體區段的致癌基因及抑癌基因，是以後的基礎研究重點。

另外以 informative rate 較高的三、四核甘酸重覆序列的多形標記，進行失異合性的定位，結果發現依 3,787 個可提供訊息的資料，在這些鼻咽癌檢體的三個染色體上，平均每個檢體可有 78 (59%)個可供判讀的標記，有 70% (34/48)出現片段的等位基因缺失(fractional allelic loss, FAL)，FAL 在每個染色體臂的頻率是 3p : 96% (46/48)，3q: 85% (41/48)，9p :42% (20/48)，9q :71% (34/48)，11p : 38% (18/48)，11q: 92% (44/48)，染色體 3、9、11 上所有標記的等位基因缺失之頻率分別是 24%，20%及 21%，為了排除 FAL 可能是由於隨機的因素，以及避免癌症檢體中有正常細胞的干擾，只有十個以上的標本出現同一個等位基因的缺失，或等位基因缺失的頻率超過該染色體上者的平均數，才認為是有意義的 LOH。本研究的結果顯示常見的缺失段位於以前報告過的 3p14-21(再縮小為 3p24.3-21.31 及 3p14.3-13),9p21-23,11q13-21 (可再縮小到 11q14.3)和 11q21-23(可再縮小到 11q22.1-23.2)，此外有八個新發現常見的缺失段位於 3p25.2-25.1，3q22.1-23，3q26.2-27.1，3q29，9q21.32-22.2，9q34.12-34.3，11p15.5-15.4 及 11q24.3-25。最後經過比對分析，可定出三段最小重疊的 LOH 區域：3p25.3-24.1 (D3S2403-D3S4535，< 19 cM)、3p23-21.31 (D3S1768-D3S1766，< 9 cM) 及 11q22.1-23.2 (D11S2000-D11S965，< 8 cM)，而且發生 LOH 的比率分別高達 75% (36/48)，65% (31/48)，67% (32/48)。1 cM 約有  $10^6$  鹼基對，本研究已將最小重疊的 LOH 區域縮小到 8-19 cM，等於只要研究  $8-19 \times 10^6$  鹼基對，配合電腦分析，便有可能找到參與鼻咽癌致病過程的抑癌基因。此外利用 informative rate 較高的三、四核甘酸重覆序列的多形標記，可以區分後來出現的腫瘤，是復發或是第二個原發腫瘤，如果前後兩個腫瘤有相同的標記出現 LOH，表示後來出現的腫瘤是復發，如果前後兩個腫瘤有不同的標記出現 LOH，表示後來出現的腫瘤是第二個原發腫瘤。

另外等位基因缺失和鼻咽癌分期相關性的統計分析，顯示標記 D9S318、D11S1304 分別所在的 9q21.3-22.21、1q24.3-25 之等位基因缺失和 N2/N3 有顯著相關性( $p=0.035$ 、 $p=0.005$ )；標記 D9S905、D11S1304 分別所在的 9q34.1-34.3、11q24.3-25 之等位基因缺失和晚期的鼻咽癌有顯著相關性( $p=0.022$ 、 $p=0.017$ )。因此對放射線治療或化學治療前所作切片的標本，先萃取其 DNA，以標記 D9S318、D11S1304、D9S905 及 D11S1304 檢查有無 LOH，如果有 LOH，便要及早治療或加重治療，免得腫瘤惡化或復發於頸部，或於追蹤期間密切注意頸部有無復發，以期早點發現頸部復發。

雖然 *FHIT* 所在的 3p14.3-13 之等位基因缺失和早期的鼻咽癌有顯著相關性，但是從 21 個鼻咽癌組織的 *FHIT*、*p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 之轉錄區，並沒有發生突變。然而，在三個細胞株中，可在 HONE-1 的 *FHIT* 發現兩個點突變：Ser77Pro 及 Gln90Arg；CNE-1 的 *FHIT* 發現一個點突變。位於 3p14.2 的 *FHIT* 包括最易受誘發的脆弱點 FRA3B，Chan 等人(2000)的報告指出，香港流產胎兒的正常鼻咽表皮細胞都沒有出現 3p 染色體的 LOH，但香港成年人的正常鼻咽表皮細胞，在 3p 染色體出現 LOH 的比率是 73.9%，而在安徽、北京的華人及西方人者只有 20% 出現 LOH，表示來自高危險區者之正常鼻咽表皮細胞 3p 染色體，比較容易受到破壞，而導致較高比率出現鼻咽癌。後續以雷射捕捉顯微鏡取得較不含正常細胞的鼻咽癌細胞，進行 *FHIT* 的 RT-PCR，序列分析，看看有無 *FHIT* 的缺失或 EBV DNA 的嵌入，如果沒有 *FHIT* 的缺失，進一步在原發的鼻咽癌組織中研究有無各種後成的因素(epigenetic factor)，如基因的甲基化，致使沒有點突變的正常 *FHIT* 基因失去作用，而導致鼻咽癌，將可釐清 *FHIT* 基因在鼻咽癌致病過程的角色。此外，可以看看有無 3p 染色體的 LOH，來篩選鼻咽癌的高危險群，首先可以用 anti-EBV VCA IgA 及 anti-EBV DNase，來篩選出高抗體力價者，或蒐集鼻咽癌病患的一等親，取其鼻咽部的脫落細胞，萃取 DNA，看看有無 3p 染色體的 LOH，如果有 3p 染色體的 LOH，便更密集追蹤檢查，以期早點發現鼻咽癌。

從 *INK4a/ARF* 轉錄出的 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>*，則在三個細胞株都可發現於 intron 1 和 exon 2 交接處，出現 A→C 的點突變，後來經 RT-PCR 及序列分析，發現有捨接失誤，漏掉 exon 2，出現較短的 mRNA。本研究 21 個鼻咽癌組織的 *FHIT*、*p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 之轉錄區，雖然沒有發生突變，並不能抹煞 *FHIT*、*p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 在鼻咽癌致病過程的角色，各種後成的因素(epigenetic factor)，如基因的甲基化，仍會使得沒有點突變的正常基因失去作用，而導致鼻咽癌的形成。以後繼續以雷射捕捉顯微鏡取得較不含正常細胞的鼻咽癌細胞，進行 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 的甲基化研究，同時可將正常的 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 的轉染到本研究的三個細胞株，觀察三個細胞株生長受抑制的情形，將有助釐清 *p16<sup>INK4a</sup>* 和 *p19<sup>ARF</sup>* 基因在鼻咽癌致病過程的角色。

# 論文英文簡述

Cigarette smoking and alcohol consumption are the major risk factors of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). However, only a fraction of exposed individuals develop cancers, an intrinsic susceptibility to environmental genotoxic insults has been suggested as playing a role in carcinogenesis. In the general population, there may exist varying degree of deoxyribonucleic acid (DNA) repair capacity. To investigate this hypothesis, Hsu et al developed an in vitro assay in which the number of chromatid breaks was scored in metaphases of culture lymphocytes challenged with bleomycin in the G<sub>2</sub> phase of cell cycle. It has now been shown that mutagen sensitivity determines a susceptible phenotype and is a risk factor for the development of a HNSCC, as well as a secondary primary cancer. However, head and neck cancers represent a heterogenous group of neoplasms. Nasopharyngeal carcinoma (NPC) has the highest rate of distant metastasis among head and neck cancers. The association of Epstein-Barr virus (EBV) and NPC is unique. Neither alcohol consumption nor cigarette smoking has a significant effect on the risk of NPC and a hereditary component explains more than 50% of the NPC risk among Chinese in Taiwan. To evaluate the difference of mutagen sensitivity among noncancer, NPC, and other head and neck cancer patients, we used bleomycin assay and compared the mean number of chromatid breaks per cell among different groups. Mutagen sensitivity test with bleomycin can determine a susceptible phenotype, which is only relevant in organs and tissues that have direct contact with the external environment. Patients with head and neck cancers have more mutagen sensitivity than noncancer controls and the hypersensitive phenotype has a risk for the development of a second primary cancer. The biological behaviors of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and other head and neck cancers are much different.

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is one of the most common head and neck cancers in Southeast Asia and believed to have a multifactorial etiology. The incidence of NPC in 100,000 persons per year is generally less than 1 person in the whole world, but is increased to 5.12 persons in Taiwan and 12.9 persons in the Southern China. Both environmental and genetic factors have been implicated in the tumor formation of NPC. Among environmental factors, consumption of Cantonese salted food and infections of Epstein-Barr virus (EBV) are most documented. By in situ hybridization, EBV DNA is detected in 81.7% and 100% of NPC tissues with biotin- and radioisotope-labeled probes, respectively. In addition to environmental ones, familial clustering of NPC has also been reported. For example, Chinese NPC patients have higher frequencies of HLA antigens A2 and BW46 7. A linkage study based on affected sib pairs suggested that a gene closely linked to the HLA locus confers a greatly increased risk of NPC. By histological classification, over 95% of NPC cases are nonkeratinizing or undifferentiated carcinomas, belonging to World Health Organization types 2 and 3, respectively. Since most NPC tumors are sensitive to radiotherapy, the cure rate is relatively high if the disease is diagnosed at an early stage. However, poor prognosis and low 5-year survival rates are often associated with locoregional recurrence and distant metastasis. About 18% of NPC patients suffer from recurrence within 10 years after the initial treatment. The pathogenesis of NPC, like that of most solid tumors, remains elusive. Environmental, genetic, and virological factors have all been implicated. For example, Epstein-Barr virus infection has been closely associated with the development of NPC, especially with WHO type 2 and type 3 carcinomas. Food, such as Cantonese salted fishes, and cigarette smoking have all been considered risk factors for NPC. In addition, Wu et al have also reported that people with human leukocyte antigen (HLA) type A2 and B16 in Taiwan had a relatively high predisposition to suffer from NPC. Recently, evidence has been accumulated suggesting that multiple-step genetic alterations, including the activation of oncogenes and/or inactivation of tumor suppressor genes, may underlie NPC tumorigenesis. A tumor suppressor gene, *p16/MTS1*, was noted to exhibit homozygous deletion or a reduced expression level in NPC tissues. Overexpression of the *MYC* and *RAS* oncogenes was also detected in some NPC tumors. Furthermore, loss of heterozygosity (LOH) studies indicated the presence of several tumor suppressor genes at chromosome arms 3p, 9p, and 11q. By conventional cytogenetic studies, researchers have identified genomic defects involving chromosomes 1, 3, 5, 8, 11, 12, and 17 using tumor specimens obtained from biopsies,

NPC xenografts, and cell lines. Among these studies, changes at 3q, especially at 3q25-ter, were most frequently observed. In this study, we have used comparative genomic hybridization (CGH) to survey the genomic imbalance of NPC. A total of 51 NPC tumors were analyzed. Some of the chromosomal imbalance sites detected coincided with the sites of known oncogenes/tumor suppressor genes, whereas others did not, suggesting the presence of novel NPC tumor-related genes at these loci.

In Taiwan, the curative rate of 5-year survival is greater than 60% in all and 80% in early-stage NPC patients after radiotherapy and/or chemotherapy. Unfortunately, the incidence of NPC peaks at productive age of 45-55 years old. Therefore, early diagnosis developed from molecular genetic studies of NPC formation will potentially improve treatment and clinical management. Molecular aberrations on cancer chromosomes have been shown to associate with the development of solid tumors. The molecular mechanisms of chromosomal aberrations indicate that the process of tumorigenesis is the accumulation of chromosomal damages such as the activation of oncogenes, the inactivation of tumor suppressor genes (TSGs), and the mutation of mutator genes which are engaged in the repair, replication and stability of genome. These chromosomal alterations, especially the loss of heterozygosity, have been successfully applied to localize the regions of recurrent deletions and ultimately facilitate the positional cloning of cancer genes. Indeed, many of the TSGs, including *DCC* and *APC* in colon cancer, *DPC4* in pancreatic cancer, *PTEN* in prostate and other cancers, were initially localized through the evidence of LOH and eventually identified by the technique of positional cloning. Previous cytogenetic studies of NPC biopsy specimens and cell lines have detected deletions of the short arms in chromosomes 3 and 9. LOHs were found on chromosome arms 3p, 9p, and 11q in NPC by using restriction fragment length polymorphism, and more recently by the use of microsatellite markers. Recent studies of genome-wide allelotyping by 382 microsatellite markers with 10 cM resolution on 27 microdissected primary NPC tissues also detected high frequencies of allelic imbalance on chromosome arms of 3p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q and 16q. Since recurrent deletions occurred mainly on chromosomes 3, 9 and 11 in NPC, it is important to further refine these deletions for positional candidate cloning of TSGs and to develop molecular genetic methods for better treatment and management of NPC.

Recurrent deletion on a chromosomal location of cancer cells can be detected by frequent allelic loss and is generally considered as an indication for the existence of a tumor suppressor gene (TSG) in the region. In this study, using fluorescent-labeled, highdensity microsatellite markers for allelotyping, we pinpointed three minimal deleted regions (MDRs) and screened mutations of putative TSGs on chromosomes 3, 9 and 11 in nasopharyngeal carcinoma occurred in Taiwan.

To evaluate the difference of mutagen sensitivity among noncancer, NPC, oral and oropharyngeal cancers (ORC), laryngeal and hypopharyngeal cancers (LHC), bleomycin assay in which the number of chromatid breaks per cell (b/c) was scored in metaphases of cultured lymphocytes in 35 patients of each group was performed. To investigate the genomic imbalances associated with nasopharyngeal carcinoma (NPC), we have performed chromosome analysis by comparative genomic hybridization (CGH) on 51 tumors, including 25 primary and 26 recurrent tumors. And we used a total of 133 informative microsatellite markers on chromosomes 3, 9 and 11 with an average marker density of 4 cM for allelotyping of genomic DNAs isolated from NPC tissues and their corresponding lymphocytes of 48 patients. Correlation of allelic loss with clinicopathological parameters of NPC tissues was examined. In addition, putative TSGs including *FHIT*, *p16INK4a*, *p19ARF* were selected for mutation screening to investigate their potential participations in the tumorigenesis of NPC.



The mean ages of control group and cancer groups of NPC, ORC, and LHC were  $46.7 \pm 16.0$ ,  $45.9 \pm 14.5$ ,  $50.1 \pm 11.0$ , and  $60.4 \pm 10.6$  years, respectively. The mean age of LHC group was higher than those of other 3 groups ( $p < 0.001$ ). The mean values of b/c  $> 1.1$  (the mean value of control persons plus one standard deviation) was defined to be a hypersensitive phenotype. The mean values of b/c in the control, NPC, ORC, and LHC groups were  $0.80 \pm 0.32$ ,  $1.03 \pm 0.45$ ,  $1.30 \pm 0.44$ , and  $1.35 \pm 0.46$ , respectively. Frequency analysis showed pronounced difference between groups. There were no control patients with a b/c score of  $> 1.50$ . Of the cancer patients, 63%, 69% of patients with ORC, LHC, respectively were in the hypersensitive region of  $> 1.1$ , compared to only 17% of the controls, whereas 43% of the patients with NPC revealed hypersensitive. Student's *t* tests showed that ORC, LHC and NPC groups had very significantly higher mean values of b/c than that of controls. A significant difference in the mean value of b/c was found between NPC and LHC groups ( $p < 0.05$ ).

We have performed CGH analysis on 25 primary tumors (cases 1-25) and 26 recurrent tumors (cases 26-51) that had been exposed to radio- and/or chemotherapy. Among the total of 51 NPC specimens, 15 cases (18-25 and 45-51) exhibited no significant CGH abnormality. The remaining 36 samples, including 17 primary (cases 1-17) and 19 recurrent tumors (cases 26-44), showed profound chromosomal changes. At least two separate hybridization experiments were performed in each case; the resulting CGH patterns were essentially the same (data not shown). Note that certain chromosomal regions, such as 1pter, 16p, 19, and 22, have been shown often to exhibit problematic CGH changes; positive findings over these sites should be interpreted with caution.

We counted each chromosome change (including both gains and losses) that occurred on a chromosome arm as a unit event for genomic alteration and calculated the total chromosomal change events among the primary or recurrent NPC tumors. A total of 131 events (50 losses and 81 gains) were found in the 17 informative primary NPC samples. The loss events (to the left of the chromosome ideogram) appeared to cluster to limited chromosome regions; 76% of them were observed on chromosome arms 3p, 5q, 9p, 11q, 13q, and 14q. The minimal overlapping regions were at 3p12-14, 5q21-23, 9p21-23, 11q14-23, 13q21-32 and 14q12-21. On the other hand, the amplification events (to the right of the chromosome ideogram) seemed to scatter over more chromosome arms than the loss events. About half of the gain abnormalities occurred

on chromosome arms 1q, 11q, 12p, 12q, and 17q. The minimal overlapping regions for gain defects were at 1q21-22, 11q13, 12p12-13, 17q21, and 17q25.

Similar results were found in the 19 informative recurrent NPCs; major aberration in the total of 118 events of genomic change was composed of 48 losses and 70 gains (to the left and right of the chromosome ideogram, respectively). Note, however, that the most frequent gain in primary tumors occurred on chromosome arm 12p (59%), whereas the most common amplification site in the recurrent tumors was on arm 11q (53%). Interestingly, the frequencies of chromosomal aberrations occurring on 12q, 9p, and 14q actually decreased in the recurrent tumor compared with those found in the primary NPCs ( $p < 0.05$ ).

We have also grouped the CGH findings according to the clinical stage of the patients. We found that tumor samples from early stages (I and II) seemed to contain fewer detectable genetic changes than those observed in the advanced cases (stages III and IV). Specifically, there were on average 0.8 losses and 3.8 gains per sample in stage II primary tumors; these numbers increased to 4.0 losses and 7.7 gains and 3.8 losses and 4.3 gains in NPCs of stages III and IV, respectively. The differences between stages II and III or IV in the primary NPCs was statistically significant ( $p < 0.05$ ). Although the difference among recurrent tumors was not statistically significant, the tendency of the increase was still noticeable, especially when comparing stage II to stage IV.

Pathohistological analysis of the tumor samples was performed by experienced pathologists on 10 of the 15 noninformative cases that showed no significant chromosomal change by CGH. In nine of them, 40% to 90% of the sample tissues consisted of tumor cells. A dilution effect from normal cell contamination was therefore not the major causes for the negative CGH finding in these samples. In the 15 CGH-negative samples, 9 cases belonged to clinical stages I and II. In the remaining six cases of late-stage tumors, the proportion of tumor was too low in one case (49) and not determined in four others (cases 23 and 51).

Based on 3,787 informative data, we detected average 78 (59%) informative loci per sample and 70% (34/48) fractional allelic loss (FAL) on chromosomes 3, 9 and 11 in NPC samples. The frequencies of FAL for each chromosome arms are 96% (46/48) for 3p, 85% (41/48) for 3q, 42% (20/48) for 9p, 71% (34/48) for 9q, 38% (18/48) for 11p, and 92% (44/48) for 11q. The average allelic loss frequencies for all markers on NPC chromosomes 3, 9 and 11 are 24%, 20% and 21%, respectively. To exclude the random event of allelic loss and to avoid the deletion-masking problem from normal

cells contaminated in tumor samples, we only considered loci that the number of allelic losses was over 10 cases and the frequencies of allelic loss were above the average on the particular chromosome. In summary, we have identified 13 common LOH loci and regions commonly observed on chromosomes 3, 9 and 11 in NPC. Among them, 8 frequent LOH loci at 3p25.2-25.1, 3q22.1-23, 3q26.2-27.1, 3q29, 9q21.32-22.2, 9q34.12-34.3, 11p15.5-15.4, and 11q24.3-25 were identified first time. In addition, four previously reported loci were also identified including 3p21-14, 9p21-23, 11q13-21 and 11q21-23. Among them, 11q13-21 and 11q21-23 were refined to 11q14.3 and 11q22.1-23.2 by our study, respectively, whereas the 3p21-14 locus was splitting into 3p24.3-p21.31 and 3p14.3-13 due to interruption of informative markers (data not shown).

Two allelic loss loci, 9q21.3-22.2 and 11q24.3-25, detected by D9S318 ( $p = 0.035$ ) and D11S1304 ( $p = 0.005$ ), respectively, were frequently observed in NPC tissues classified at N2/N3. Two other allelic loss loci, 9q34.1-34.3 and 11q24.3-25, detected by D9S905 ( $p = 0.022$ ) and D11S1304 ( $p = 0.017$ ), respectively, were associated with grouped stages III/IV. Recent studies indicated that the allelic loss loci on 9q22-23 and 11q24.3-25 have significant associations with advanced stage in ovarian, breast and cervical cancers.

After comprehensive allelotyping on NPC chromosomes 3, 9 and 11, the profiles of allelic loss patterns of each NPC cases were constituted based on the relative genetic distances of markers. To facilitate potential positional cloning of TSGs, the interstitial deletions in each NPC samples were aligned for the definition of minimal LOH overlapping regions on continuous and frequent LOH markers across NPC cases. We selected two continuous allelic loss regions from informative cases (3p and 11q) and defined three distinct LOH overlapping regions on 3p25.3-24.1(D3S2403-D3S4535, < 19cM), 3p23-21.31(D3S1768-D3S1766, < 9 cM ) and 11q22.1-23.2 (D11S2000-D11S965, < 8 cM ) from our data. Deletion of each MDRs was found in 75% (36/48), 65% (31/48), and 67% (32/48) NPC tumors to loci 3p25.3-24.1, 3p23-21.31, and 11q22.1-23.2, respectively. We compared our MDRs with results previously generated from LOH analysis or from functional suppression of NPC tumorigenicity by other groups indicated that our definition of three MDRs are currently the smallest consensus deleted regions on NPC chromosomal regions.

Having identified frequent LOH regions on chromosome 3, 9 and 11, we next searched TSGs residing in these regions and investigated their possible involvement in the tumorigenesis of NPC. Three candidate genes, *FHIT*, *p16<sup>INK4a</sup>*, and *p19<sup>ARF</sup>*, located in two cytogenetic loci 3p14.3-13 and 9p22.1- 13.3 were selected for mutation analysis. The *FHIT* gene was identified and cloned in a hereditary renal carcinoma-associated t(3;8) translocation. Since then, the deletion of its genomic structure, aberrant transcription of *FHIT* gene and the reduction or absence of FHIT protein was frequently found in many cancers. Recently, the heterozygous *FHIT* mice (+/-) were shown to develop multiple tumors after challenge of carcinogen. These findings strongly suggest the function of FHIT as a TSG. In addition, several lines of evidence supported that both *p16<sup>INK4a</sup>* and *p19<sup>ARF</sup>* genes function as TSGs in various cancers. The *p16<sup>INK4a</sup>* functions as an inhibitor of cdk4/6 and blocks the passage from G1 to S with functional pRB in cells. The *p19<sup>ARF</sup>* induces both cell-cycle arrest and apoptosis, and blocks *myc/ras* transformation in a p53-dependent manner. Homozygote deletion and aberrant transcriptional inactivation due to hypermethylation of *p16<sup>INK4a</sup>* were detected in many types of tumor cell lines including NPC. Since no point mutation of *p16<sup>INK4a</sup>* in the coding regions was reported and since the role of p19ARF is unknown for the dual transcripts in NPC, we performed mutational screening on the *INK4a/ARF* locus for examining their potential participation in the NPC. Although frequent LOH has been observed in these cytogenetic loci, no mutation was detected in the coding region of genes *FHIT*, *p16<sup>INK4a</sup>*, and *p19<sup>ARF</sup>* from 21 NPC tissues (data not shown). However, in 3 available NPC cell lines, two point mutations, Ser77Pro and Gln90Arg, were found in the coding region of *FHIT* gene in HONE-1 cells, whereas synonymous mutations were detected in CNE-1 cells. Although the biological consequence of the two point mutations found in HONE-1 cells remains unclear, they represent a few cases of point mutation of *FHIT* gene reported by now. Furthermore, an A to C transversion was detected on the sharing junction of intron 1/ exon 2 splicing acceptor site of the *INK4a/ARF* locus in all three NPC cell lines tested. The identification of this mutation prompted us to investigate whether the splicing of both *p16<sup>INK4a</sup>* and *p19<sup>ARF</sup>* transcripts are affected. Smaller RT-PCR products of both *p16<sup>INK4a</sup>* and *p19<sup>ARF</sup>* were detected from NPC cell lines in comparison with that of control cell line. Sequencing analysis of aberrant *p16<sup>INK4a</sup>* and *p19<sup>ARF</sup>* PCR products indicated that the mutated intron 1/exon 2 splicing acceptor site leads to a skip of exon 2 and a joint of exon 1 to exon 3 in both transcripts.

**CONCLUSIONS.** Patients with NPC had less mutagen sensitivity than those with ORC or LHC. Our results supported the different clinical and epidemiological findings between NPC and other head and neck cancers. Our results provide a first comprehensive view of the genomic changes associated with NPC and reveal several new sites of genomic imbalance, indicating the possible involvement of novel oncogenes/tumor suppressor genes in the carcinogenesis of NPC. High-density allelotyping allows us to discover three MDRs on 3p25.3-24.1 (< 19 cM), 3p23-21.31 (<9 cM) and 11q22.1-23.2 (< 8 cM) and the correlation of allelic loss with clinicopathological parameters of NPC tissues. More importantly, one somatic mutation in NPC cell lines on the intron 1/exon 2 splicing acceptor site of the *INK4a/ARF* locus results in exon 2 skipping of both *p16<sup>INK4a</sup>* and *p19<sup>ARF</sup>* transcripts which presumably inactivates the functions of both *p16<sup>INK4a</sup>* and *p19<sup>ARF</sup>* proteins.

# 參 考 文 獻

- Albeck H, Bentzen j, Ockelmann HH, Nielsen NH, Bretlau P, Hansen HS (1993): Familial clusters of nasopharyngeal carcinoma and salivary gland carcinoma in Greenland natives. *Cancer* 72:196-200.
- AJCC Cancer Staging Manual (1997). Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publishers.
- Armsrong RW, Armstrong MJ, Yu MC, et al (1983): Salted fish and inhalants as risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Malay Asian Chinese. *Cancer Res* 43:2967-2970.
- Baffa R, Negrini M, Mandes B, et al (1996): Loss of heterozygosity for chromosome 11 in adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 56:268-272.
- Barnes LD, Garrison PN, Spirashvili Z, et al (1996): Fhit, a putative tumor suppressor in human, is a dinucleoside 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>3</sup>-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35:11529-11535.
- Baron AE, Franceschi S, Barra S, Talamini R, La Vecchia C (1993): A comparison of the joint effect of alcohol and smoking on the risk of cancer across sites in the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2:519-523.
- Beijing CI (1978): Establishment of an epitheloid cell line and a fusiform cell line from a patient with nasopharyngeal carcinoma. *Sci Sin* 21(1):127-134.
- Benvenuto G, Li S, Brown SJ, et al (2000): The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene* 19:6306-6316.
- Betuel H, Camoun M, Colombani J, Day NE, Ellouz R, de-The G (1975): The relationship between nasopharyngeal carcinoma and the HL-A system among Tunisians. *Int J Cancer* 16:249-254.
- Blair A, Stewart P, O'Berg M, et al (1986): Mortality among industrial workers exposed to formaldehyde. *JNCI* 76:1071-1084.
- Boldog FL, Gemmill RM, West J, et al (1997): Chromosome 3p14 homozygous deletions and sequence analysis of FRA3B. *Hum Mol Genet* 6:193-203.
- Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL (1998): Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet* 63(3):861-869.
- Burger RM, Peisach J, Horwitz SB (1981): Mechanism of bleomycin action: In vitro studies. *Life Sci* 28:715-727
- Burke L, Han MA, Freedman AN, et al (1998): Allelic deletion analysis of the *FHIT* gene predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 58:2533-2536.
- Burt RD, Vaughan TL, McKnight B (1992): Descriptive epidemiology and survival analysis of nasopharyngeal carcinoma in the United States. *Int J Cancer* 52:549-556.
- Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D (1994): Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res* 54:1422-1424.
- Cairns P, Tokino K, Eby Y, Sidransky D (1995): Localization of tumor suppressor loci on chromosome 9 in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 55:224-227.
- Cawkwell L, Bell SM, Lewis FA, Dixon MF, Taylor GR, Quirke P (1993): Rapid detection of allele loss in colorectal tumors using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br J Cancer* 67:1262-1267.
- Chan ASC, To KF, Lo KW, et al (2000): High frequency of chromosome 3p deletion in histologically normal nasopharyngeal epithelia from southern Chinese. *Cancer Res* 60:5365-5370.

- Chan SH, Day NE, Kunaratnam N, Chia KB, Simons MJ (1983): HLA and nasopharyngeal carcinoma in Chinese- a further study. *Int J Cancer* 32:171-176.
- Chen CJ, Liang KY, Chang YN, et al (1986): Risk factors for nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res* 6:791-796.
- Chen CJ, Liang KY, Chang YS, Wang YF; Hsieh T, Hsu MM, Chen JY, Liu MY (1990): Multiple risk factors of nasopharyngeal carcinoma: Epstein-Barr virus, malarial infection, cigarette smoking and familial tendency. *Anticancer Res* 10:547-553.
- Chen CL, Wen WN, Chen JY, Hsu MM, Hsu HC (1993): Detection of Epstein-Barr virus genome in nasopharyngeal carcinoma by in situ DNA hybridization. *Intervirology* 36(2):91-98.
- Chen YJ, Ko JY, Chen PJ, et al (1999): Chromosomal aberrations in nasopharyngeal carcinoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 25:169-175.
- Chenevix-Trench G, Kerr J, Friedlander W, et al (1994): Homozygous deletions on the short arm of chromosome 9 in ovarian adenocarcinoma cell lines and loss of heterozygosity in sporadic tumors. *Am J Hum Genet* 55:143-149.
- Cheng RYS, Lo KW, Huang DP, Tsao SW (1997): Loss of heterozygosity on chromosome 14 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol* 10:1047-1050.
- Cheng SH, Tsai SY, Yen KL, et al (2000): Concomitant radiotherapy and chemotherapy for early stage nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 18(10):2040-2045.
- Cheng Y, Poulos NE, Lung ML, Hampton G, Ou B, Lerman MI, Stanbridge EJ (1998): Functional evidence for a nasopharyngeal carcinoma tumor suppressor gene that maps at chromosome 3p21.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3042-3047.
- Cheng Y, Stanbridge EJ, Kong H, Bengtsson U, Lerman MI, Lung ML (2000): A functional investigation of tumor suppressor gene activities in a nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1 using a monochromosome transfer approach. *Genes Chromosomes Cancer* 28(1):82-91.
- Chiang TC, Griem ML (1973): Nasopharyngeal Carcinoma. *Surg Clin North Am* 53:121-133.
- Cloos J, Steen I, Joenje H, Ko JY (1993): Association between bleomycin genotoxicity and non-constitutional risk factors for head and neck cancer. *Cancer Letters* 74:161-165.
- Coffin CM, Rich SS, Dehner LP (1991): Familial aggregation of nasopharyngeal carcinoma and other malignancies. A clinicopathologic description. *Cancer* 68(6):1323-1328.
- Croce CM, Sozzi G, Huebner K (1999): Role of *FHIT* in human cancer. *J Clin Oncol* 17:1618-1624.
- Deng YF, Tian F, Lu YD, et al (2001): Mutation and abnormal expression of the fragile histidine triad gene in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 111:1589-1592.
- Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP (1996): Preferential formation of benzopyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in *p53*. *Science* 274:430-432.
- Department of Health, Executive Yuan, Republic of China (2001): Annual Report of Cancer Registration: Taiwan Area in 1997.
- Ding X, Koop DR, Crump BL, et al (1986): Immunochemical identification of cytochrome P-450 isoenzyme 3a (P450alc) in rat nasal and kidney microsomes and evidence for differential induction by alcohol. *Molec Pharmacol* 30:370-378.
- du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:27-41.



- Edelman DB, Meech R, Jones FS (2000): The homeodomain protein Barx2 contains activator and repressor domains and interacts with members of CREB family. *J Biol Chem* 275:21737-21745.
- Editorial (1976): Aetiology of nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2:1393-1394.
- Evans MF, Koreth J, Bakkenist CJ, Herrington CS, McGee JO (1998): Allelic deletion at 11q23.3-q25 is an early event in cervical neoplasia. *Oncogene* 16(19):2557-2564.
- Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, et al (2000): Muir-Torre-Like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4742-4747.
- Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP (1997): Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13:405-409.
- Gabra H, Watson JE, Taylor KJ, et al (1996): Definition and refinement of a region of loss of heterozygosity at 11q23.3-q24.3 in epithelial ovarian cancer associated with poor prognosis. *Cancer Res* 56(5):950-954.
- Gajwani BW, Devereaux JM, Beg JA (1980): Familial clustering of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 46:2325-2327
- Gantt R, Parshad R, Price FM, Sanford KK (1986): Biochemical evidence for deficient DNA repair leading to enhanced G2 chromatid radiosensitivity and susceptibility to cancer. *Radiat Res* 108: 117-126.
- Glaser R, Zhang HY, Yao KT, et al (1989): Two epithelial tumor cell lines (HNE-1 and HONE-1) latently infected with Epstein-Barr virus that were derived from nasopharyngeal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23):9524-9528.
- Gonzalez MV, Pello MF, Lopez-Larrea C, Suarez C, Menendez MJ, 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.
- Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grez H, Hadaezek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T (1997): Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res* 57:481-487.
- Gulley ML, Nicholls JM, Schneider BG, Amin MB, Ro JY, Geradts J (1998): Nasopharyngeal carcinomas frequently lack the p16/MTS1 tumor suppressor protein but consistently express the retinoblastoma gene product. *Am J Pathol* 152(4):865-869.
- Habuchi T, Devlin J, Elder PA, Knowles MA (1995): Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumor suppressor loci. *Oncogene* 11:1671-1674.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al (1996): DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271(5247):350-353.
- Hammon MG, Hsu MM, Ko JY, Hsieh RP, Yang CS (1990): Preliminary results of HLA class I and class II antigen in Chinese with nasopharyngeal carcinoma. In: Ablashi DV, Huang AT, Pagano JS, Pearson GR, Yang CS. *Epstein-Barr Virus and Human Disease*. New Jersey, Humana Press, 407-411.
- Hildesheim A, Levine PH (1993): Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev* 15(2):466-485.
- Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, et al (1997): CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 89:1207-1212.
- Hirayama T (1978): Descriptive and analytical epidemiology of nasopharyngeal cancer. *IARC Sci Publ* 78:167-189.
- Ho JHC (1972): Nasopharyngeal carcinoma. In: *Advances in Cancer Research*, Klein G, Weinhouse S, Haddow A (eds), NY Academic Press, 15:57-92.
- Hong Kong Department of Medical and Health Service (1984-1985)(DMHS): Annual

Department Report.

- Hong RL, Sheen TS, Ko JY, Hsu MM, Wang CC, Ting LL (1999): Induction with mitomycin C, doxorubicin, cisplatin and maintenance with weekly 5-fluorouracil, leucovorin for treatment of metastatic nasopharyngeal carcinoma: a phase II study. *Br J Cancer* 80:1962-1967.
- Hong RL, Ting LL, Ko JY, Hsu MM, Sheen TS, Lou PJ, Wang CC, Chung NN, Lui LT (2001): Induction chemotherapy with mitomycin, epirubicin, cisplatin, fluorouracil, and leucovorin followed by radiotherapy in the treatment of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 19:4305-4313.
- Hsieh T (1971): Clinical and statistical studies of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. In: *Proceedings of the Second Asia-Oceania Congress of Otolaryngology*. Taipei, Taiwan; Darwin Press, 546-556.
- Hsu MM, Chiou JF, McCabe EB (1974): EB virus antibody in nasopharyngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 83:19-25.
- Hsu MM, Wang KR, Lynn TC, Hsieh T, Huang SC, Tu SM (1980): Immunological reactivity in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 88:384-390.
- Hsu MM, Huang SC, Lynn TC, Hsieh T, Tu SM (1982): The survival of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 90:289-295.
- Hsu MM, Ko JY, Chang YL (1991): Elevated levels of soluble interleukin 2 receptor and tumor necrosis factor in nasopharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117:1257-1259.
- Hsu MM (1992): Clinical application of Epstein-Barr virus serology for patients with nasopharyngeal carcinoma. In BF McCabe, JE Veldman, G Mogi (eds.): *Immunobiology in Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, Kugler Publications, Amsterdam/ New York, pp. 303-308.
- Hsu MM, Chen YJ, Chang YL, Ko JY, Sheen TS (1995): Soluble interleukin-2 receptor as a clinical parameter for nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 13:1-4.
- Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, et al (1989): Sensitivity to genotoxic effects in human: Possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 43:403-409.
- Hu LF, Eiriksdottir G, Lebdleva T, Kholodniouk I, Alimov A, Chen F, Luo Y, Zabarovsky ER, Ingvarsson S, Klein G, Ernberg I (1996): Loss of heterozygosity on chromosome arm 3p in nasopharyngeal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 17:118-126.
- Huang DP, Lo KW, Choi PH, et al (1991): Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 54:91-99.
- Huang DP, Lo KW, van Hasselt CA, Woo JK, Choi PH, Leung SF, Cheung ST, Cairns P, Sidransky D, Lee J (1994): A region of homozygous deletion on chromosome 9p21-22 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 54:4003-4006.
- Huang DP, Lo KW (1999): *Aetiological Factors and Pathogenesis*. Hong Kong: The Chinese University Press.
- Huang SC, Lui LT, Lynn TC (1985): Nasopharyngeal carcinoma. Study III. A review of 1206 patients treated with combined modalities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11:1789-1793.
- Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM (1998): The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* 32:7-31.
- Huet J, Laval F (1985): Potentiation of cell killing by inhibitors of poly

- (adenosinediphosphate-ribose) synthesis in bleomycin-treated Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 45:987-991.
- Hui ABY, Lo KW, Leung SF, Choi PH, Fong Y, Lee JC, Huang DP (1996): Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 11 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 56:3225-3229.
- Hui ABY, Lo KW, Leung SF, et al (1999): Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridisation. *Int J Cancer* 82:498-503.
- Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, et al (1995): Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma [published erratum appears in *JAMA* 1995 Jun 28;273(24):1908]. *JAMA* 273(7):558-563.
- Inoue h, Ishii H, Alder H, et al (1997): Sequence of the FRA3B common fragile region: implications for the mechanism of *FHIT* deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14584-14589.
- International Agency for Research on Cancer(IARC), International Association of Cancer Registries (1976): *Cancer Incidence in Five Continents*. Geneva: World Health Organization.
- Jessup JM, Gallick GE (1992): The biology of colorectal carcinoma. *Curr Prob Cancer* 16:261-328.
- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al (1996): Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272:1668-1671.
- Jones MH, Koi S, Fujimoto I, Hasumi K, Kato K, Nakamura Y (1994): Allelotype of uterine cancer by analysis of RFLP and microsatellite polymorphism: frequent loss of heterozygosity on chromosome arms 3p, 9q, 10q, and 17p. *Genes Chromosom Cancer* 9:119-123 .
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:231-243.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll P, Waldman F (1995): Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 12:213-219.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [see comments]. *Science* 264(5157):436-440.
- Kihlman BA, Sturelid S, Hartley-Asp B, Nilsson K (1973): Caffeine potentiation of the chromosome damage produced in bean root tips and in Chinese hamster cells by various chemical and physical agents. *Mutat Res* 17:271-275.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-170.
- Kirk RL, Blake NM, Serjeantson S, et al (1978): Genetic components in susceptibility to nasopharyngeal carcinoma, In: *Nasopharyngeal Carcinoma: Etiology and Control*. de-The G, Ita Y (eds) IARC 20:283-297.
- Knudson AG (1993): Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10914-10921 .
- Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J,

- Larramendy ML, Tapper J, Pere H, EI-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y (1998): DNA copy number amplifications in human neoplasms. *Am J Pathol* 152:1107-1123.
- Ko JY, Hsieh T (1988): Investigation of life quality in nasopharyngeal carcinoma patients with long-term survival after radiotherapy. *J Otolaryngol Soc ROC* 23:181-190.
- Ko JY, Braakhuis BJM, Snow GB (1993a): Genotoxicity of bleomycin of the patients with head and neck cancer. *J Otolaryngol Soc ROC* 28:45-50.
- Ko JY, Chang YL, Hsu MM (1993b): Cisplatin and 5-FU in the treatment of nasopharyngeal carcinoma with distant metastasis or recurrence. *J Otolaryngol Soc ROC* 28:318-324.
- Ko JY, Chen CL, Lui LT, Hsu MM (1996): Radiation-induced malignant fibrous histiocytoma in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:535-538.
- Ko JY, Sheen TS (1998a): Intraluminal involvement of the trachea by thyroid cancer. *J Formos Med Assoc* 97:289-291.
- Ko JY, Sheen TS, Hsu MM, Lui LT (1998b): Familial clustering of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118:736-737.
- Ko JY, Jou YS, Chen PJ, Hsu MM (1998c): Loss of heterozygosity on chromosomes 3 and 11 in a radiation-induced malignant fibrous histiocytoma --- Case report. *J Taiwan Otolaryngol Soc* 33:86-91.
- Ko JY, Lui LT, Sheen TS, Lou PJ, Hsu M (1998d): Increased mutagen sensitivity in patients with head and neck cancer is less pronounced in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:578-581.
- Ko JY, Sheen TS (1998e): Reconstruction of circumferential pharyngeal defect following cancer surgery with tubed pectoralis major myocutaneous flap and interdigitating anastomosis. *J Formosan Med Assoc* 97:360-363.
- Ko JY, Lee TC, Hsiao CF, Lin GL, Yen SH, Chen KY, Hsiung CA, Chen PJ, Hsu MM, Jou YS. Definition of three minimal deleted regions by comprehensive allelotyping and mutational screening of *FHIT*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *p19<sup>ARF</sup>* genes in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* (in press)
- Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC (1995): Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 24:450-453.
- Kok K, Naylor SL, Buys CH (1997): Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* 71:27-92.
- Kokkola A, Monni O, Puolakkainen P, Larramendy ML, Victorzon M, Nordling S, Haapiainen R, Kivilaakso E, Knuutila S (1997): 17q12-21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a comparative genomic hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 20:38-43.
- Kristensen M, Quek HH, Chew CT, Chan SH (1991): A cytogenetic study of 74 nasopharyngeal carcinoma biopsies. *Ann Acad Med Singapore* 20:597-600.
- Kuo TM, Hsu TC (1978): Biochemical and cytological studies of bleomycin actions in chromatin and chromosomes. *Chromosoma* 68:229-240.
- Lanier AP, Bender TR, Tschopp CF, Dohan P (1979): Nasopharyngeal carcinoma in an Alaskan Eskimo family: report of three cases. *J Natl Cancer Inst* 62: 1121-1124.
- Launonen V, Stenback F, Puistola U, et al (1998): Chromosome 11q22.3-q25 LOH in ovarian cancer: association with a more aggressive disease course and involved subregions. *Gynecol Oncol* 71(2):299-304.
- Legator MS, Zimmering S (1979): Review of the genetic effect of caffeine. *J Environ*

- Sci Health 13:135-188.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712):643-649.
- Li FP, Montessano R(1994): Interactions of cancer susceptibility genes and environmental carcinogens: American Association for Cancer Research (AACR)-International Agency for Research on Cancer (IARC) Joint Conference. *Cancer Res*54:4243-4247.
- Li J, Yen C, Liaw D, et al (1997): PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275(5308):1943-1947.
- Li SY, Lin JK (1990): Differential bleomycin susceptibility in cultured lymphocytes of fragile X patients and normal individuals. *Hum Genet* 85:267-271.
- Lin CT, Kao HJ, Lin JL, Chan WY, Wu HC, Liang ST (2000): Response of nasopharyngeal carcinoma cells to Epstein-Barr virus infection in vitro. *Lab Invest* 80(8):1149-1160.
- Lin TM, Hsu MM, Chen KP, Chiang TC, Jung PF, Hirayama T (1971): Morbidity and mortality of cancer of the nasopharynx in Taiwan. *Gann Monogr* 10:137-144.
- Lin TM, Chen KP, Lin CC, et al (1973): Retrospective study on nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1403-1408.
- Lin TM, Yang CS, Tu SM, Chen CJ, Kuo KC, Hirayama T (1979): Interaction of factors associated with cancer of the nasopharynx. *Cancer* 44:1419-1423.
- Lin TM, Chang HJ, Chen CJ, et al (1990): Multiple risk factors of nasopharyngeal carcinoma: Epstein-Bar virus, malarial infection, cigarette smoking and familial tendency. *Anticancer Res*10:547-554.
- Linne OC, Sakamoto G, Lynn TC, Tu SM (1980): Nasopharyngeal carcinoma in twins. *J Otol Soc ROC* 15:50-56.
- Liu Q, Neuhausen S, McClure M, et al (1995): CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines [published erratum appears in *Oncogene* 1995 Dec 7;11(11):2455]. *Oncogene*; 10(6):1061-1067.
- Lo KW, Huang DP, Lau KM (1995): *p16* gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 55:2039-2043.
- Lo KW, Cheung ST, Leung SF, et al (1996): Hypermethylation of the *p16* gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 56:2721-2725.
- Lo KW, Teo PM, Hui AB, et al (2000): High resolution allelotype of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 60(13):3348-3353.
- Lothe RA, Karhu R, Mandahl N, Mertens F, Saeter G, Heim S, Borresen-Dale AL, Kallioniemi OP (1996): Gain of 17q24-qter detected by comparative genomic hybridization in malignant tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer Res* 56:4778-4781.
- Lu SJ, Day NE, Degos L, et al (1990): Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* 346(6283):470-471.
- Luan X, Shi G, Zohouri M, et al (1997): The FHIT gene is alternatively spliced in normal kidney and renal cell carcinoma. *Oncogene* 15(1):79-86.
- Magnusson PKE, Wilander E, Gyllensten U (1996): Analysis of loss of heterozygosity in microdissected tumor cells from cervical carcinoma using fluorescent dUTP labeling of PCR products. *BioTechniques* 21:844-847.
- Mahlamaki EH, Høglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi OP, Johansson B (1997): Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 20:383-391.
- Merino OR, Linberg RD, Fletcher GH (1977): An analysis of distant metastases from

- squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 40:145-151.
- Minobe K, Onda M, Iida A, et al (1998): Allelic loss on chromosome 9q is associated with lymph node metastasis of primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 89(9):916-922.
- Mitelman F, Mark-Vendel E, Mineur A, Giovanella B, Klein G (1983): A 3q+ marker chromosome in EBV-carrying nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 32:651-655.
- Mostert MM, van de Pol M, van Echten J, Olde Weghuis D, Geurts van Kessel A, Oosterhuis JW, Looijenga LH (1996): Fluorescence in situ hybridization-based approaches for detection of 12p overrepresentation, in particular i(12p), in cell lines of human testicular germ cell tumors of adults. *Cancer Genet Cytogenet* 87:95-102.
- Muller CY, O'Boyle JD, Fong KM, et al (1998): Abnormalities of fragile histidine triad genomic and complementary DNAs in cervical cancer: association with human papillomavirus type. *J Nat Cancer Inst* 90:433-439.
- Murphy GA, Halliday D, McLennan AG (2000): The Fhit tumor suppressor protein regulates the intracellular concentration of diadenosine triphosphate but not diadenosine tetraphosphate. *Cancer Res* 60:2342-2344.
- Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D (1994): Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 54:1152-1155 .
- Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM (1996): The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res* 56:3173-3179.
- Nevo S, Meyer W, Altman M (1971): Carcinoma of nasopharynx in twins. *Cancer* 8:807-809.
- Nippon Kayaku (1991): Bleomycin. Nippon Kayaku Co.
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Sibrashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K (1996): The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84:587-597.
- Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, et al (1994): Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23):11045-11049.
- Pearson GR, Johansson B, Klein G (1978): Antibody-dependent cellular cytotoxicity against Epstein-Barr virus-associated antigens in African patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 22:120-125.
- Pearson GR, Weiland LH, Neel HB, Taylor W, Earle J, Mulroney SE, Goepfert H, Lanier A, Talvot ML, Pilch B, Goodman M, Huang A, Levine PH, Hyams V, Moran E, Henle G, Henle W (1983): Application of Epstein-Barr virus (EBV) serology to the diagnosis of North American nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 51:260-267.
- Pearson GR, Neel HB, Weiland LH, Mulroney SE, Taylor W, Goepfert H, Huang A, Levine P, Lanier A, Pilch B, Goodman M (1984): Antibody-dependent cellular cytotoxicity and disease course in North American patients with nasopharyngeal carcinoma: a prospective study. *Int J Cancer* 33:777-782.
- Perkin/Elmer Applied Biosystems Division (1997): ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Panel Guide. Branchburg NJ, pp 15.
- Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG (1997): Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 150:81-89.
- Porter MJ, Field JK, Leung SF, Lo D, Lee JC, Spandidos DA, van Hasselt CA (1994):

- The detection of the *c-myc* and *ras* oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otol Laryngol* 114:105-109.
- Povirk LF, Austin MJF (1991): Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 257:127-143.
- Rasio D, Negrini M, Manenti G, Dragani TA, Croce CM (1995): Loss of heterozygosity at chromosome 11q in lung adenocarcinoma: identification of three independent regions. *Cancer Res* 55(18):3988-3991.
- Rassool FV, Le Beau MM, Neilly ME, van Melle E, Espinosa III R, McKeithan TW (1992): Increased genetic instability of the common fragile site at 3p14 after integration of exogenous DNA. *Am J Hum Genet* 50:1243-1251.
- Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schrock E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T (1995): Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55:5415-5423.
- Rimessi P, Gualandi F, Morelli C, et al (1994): Transfer of human chromosome 3 to an ovarian carcinoma cell line identifies three regions on 3p involved in ovarian cancer. *Oncogene* 9(12):3467-3474.
- Roush GC, Walrath J, Stayner LT, et al (1987): Nasopharyngeal cancer, sinonasal cancer, and occupations related to formaldehyde: a case-control study. *JNCI* 79:1221-1224.
- Rowley H, Jones A, Spandlos D, Feld J (1996): Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:497-501 .
- Ruas M, Peters G (1998): The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378(2):115-177.
- Sabatier L, Dutrillaux B (1988): Effect of caffeine in Fanconi anemia. *Hum Genet* 79:242-244.
- Sakata K, Tamura G, Maesawa C, et al (1995): Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 9 without pl6 gene mutation in gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 86:333-335.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh H, Lamb PW, Dong JT, et al (1993): Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer. *Mol Carcinog* 7(3):157-164.
- Schantz SP, Spitz MR, Hsu TC (1990): Mutagen sensitivity in patients with head and neck cancers: a biologic marker for multiple primary malignancies. *J Natl Cancer Inst* 82:1773-1775.
- Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schrock E, Ried T, Dietel M, Petersen I (1997): Primary small-cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations. *Int J Cancer* 74:86-93.
- Sellar GC, Li L, Watt KP, et al (2001): BARX2 induces cadherin 6 expression and is a functional suppressor of ovarian cancer progression. *Cancer Res* 61:6877-6881.
- Shanmugaratnam K, Sobin L (1978): Histological typing of upper respiratory tract tumors. *Int Typ Tumors* 19:32-33.
- Shanmugaratnam K, Sobin LH (1993): The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer* 71(8):2689-2697.

- Shao JY, Wang HY, Huang XM, et al (2000): Genome-wide allelotype analysis of sporadic primary nasopharyngeal carcinoma from southern China. *Int J Oncol* 17:1267-1275.
- Simon MJ, Day NE, Wee GB, et al (1974a): Nasopharyngeal carcinoma V: immunogenetic studies of southeast Asia ethnic groups with high and low risk for the tumor. *Cancer Res* 34:1192-1195.
- Simon MJ, Wee GB, Day NE, et al (1974b): Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma: 1. Differences in HL-A antigen profiles between patients and control groups. *Int J Cancer* 13: 122-134.
- Simoneau M, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y (1999): Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 18(1):157-163.
- Singh B, Gogineni, S, Goberdhan A, et al (2001): Spectral karyotyping analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 111:1545-1550.
- Sizhong Z, Xiukung G, Yi Z (1983): Cytogenetic studies on an epithelial cell line derived from poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 31(5):587-590.
- Smith PJ, Mircheva J, Bleehen NM (1986): Interaction of bleomycin, hyperthermia and a calmodulin inhibitor (trifluoperazine) in mouse cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12:1363-1366.
- Song B, Gelboin HV, Park S, Gonzales FJ (1986): Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. *J Biol Chem* 261:16689-16697.
- Sun Y, Hildesheim A, Lanier AE, Cao Y, Yao KT, Raab-Traub N, Yang CS (1995a): No point mutation but decreased expression of the *p16/MTS1* tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinomas. *Oncogene* 10:785-788.
- Sun Y, Hildesheim A, Li H, et al (1995b): No point mutation but a codon 31<sup>ser→arg</sup> polymorphism of the *WAF-1/CIP-1/p21* tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma (NPC): the polymorphism distinguishes Caucasians and Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:261-267.
- Taiwan Cooperative Oncological Group (2000)(TCOG): Diagnostic and treatment consensus of nasopharyngeal carcinoma. P.1-21.
- Tseng JE, Kemp BL, Khuri FR, et al (1999): Loss of *Fhit* is frequent in stage I non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Res* 59:4798-4803.
- Uzawa N, Yoshida MA, Oshimura M, Ikeuchi T (1995): Suppression of tumorigenicity in three different cell lines of human oral squamous cell carcinoma by introduction of chromosome 3p via microcell-mediated chromosome transfer. *Oncogene* 11(10):1997-2004.
- van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al (1994): Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 54:1156-1158.
- van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, et al (1997): Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. *Science* 277:805-808.
- Vaughan TL, Strader C, Davis S, et al (1986): Formaldehyde and cancers of the pharynx, sinus and nasal cavity: 1. Occupational exposures. *Int J Cancer* 38:677-683.
- Velickovic M, Delahunt B, Grebe SK (1999): Loss of heterozygosity at 3p14.2 in clear cell renal cell carcinoma is an early event and is highly localized to the *FHIT* gene locus. *Cancer Res* 59(6):1323-1326.
- Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM (1996): *FHIT* gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad*



- Sci USA 93:9770-9775.
- Waghray M, Parhar RS, Taibah K, Al-Sedairy S (1992): Rearrangements of chromosome arm 3q in poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 4:326-330.
- Ward MH, Pan WH, Cheng YJ, et al (2000): Dietary exposure to nitrite and nitrosamines and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Int J Cancer* 86(5):603-609.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992): The human genome initiative-Finding all the human genes. *Recombinant DNA*, 2nd ed. New York, WH Freeman and Company, pp 603-618.
- Weinberg RA (1991): Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146
- Williams EH, de-The G (1974): Familial aggregation in nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2:295-296.
- Willem P, Mendelow B (1997): 12p rearrangement and DNA amplification mapped by comparative genomic hybridization in a patient with secondary myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 99:30-37.
- Winqvist R, Hampton GM, Mannermaa A, et al (1995): Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis. *Cancer Res* 55(12):2660-2664.
- Wu SB, Hwang SJ, Chang AS, Hsieh T, Hsu MM, Hsieh RP, Chen CJ (1989): Human leukocyte antigen (HLA) frequency among patients with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *Anticancer Res* 9:1649-1653.
- Wu XF, Hsu TC, Annegers JF, Amos CI, Fueger JJ, Spitz MR (1995): A case-control study of non-random distribution of bleomycin-induced chromatid breaks in lymphocytes of lung cancer cases. *Cancer Res* 55:557-561.
- Yeh S, Cowdry EV (1954): Incidence of malignant tumors in Chinese, especially in Formosa. *Cancer* 2:425-436.
- Yu MC, Ho JHC, Ross RK, et al (1981): Nasopharyngeal carcinoma in Chinese—Salted fish or inhaled smoke? *Pre Med* 10:15-24.
- Zeiger MA, Gnarr JR, Zhar B, Linehan WM, Pass HI (1994): Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in mesothelioma cell lines and solid tumor. *Genes Chromosome Cancer* 11:15-20 .
- Zhang EP, Lian PG, Cai KL, Chen YF, Cai MD, Zheng XF, Guang XX (1989): Radiation therapy of nasopharyngeal carcinoma: prognostic factors based on a 10-year follow-up of 1302 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16:301-305.
- Zhuang Z, Merino MJ, Chuaqui R, Liotta LA, Emmert-Buck MR (1995): Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. *Cancer Res* 55:467-471.
- Zimonjic DB, Druck T, Ohta M, et al (1997): Positions of chromosome 3p14.2 fragile site (FRA3B) within the *FHIT* gene. *Cancer Res* 57:1166-1170.
- Zippin C, Tekawa IS, Bragg KU, Watson DA, Linden G (1962): Studies on heredity and environment in cancer of the nasopharynx. *J Natl Cancer Inst* 29:483-490.

## 附 錄

1. Ko JY, Chen CL, Lui LT, Hsu MM (1996): Radiation-induced malignant fibrous histiocytoma in patients with nasopharyngeal carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122:535-538.
2. Ko JY, Jou YS, Chen PJ, Hsu MM (1998): Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3 and 11 in a Radiation-Induced Malignant Fibrous Histiocytoma--- Case Report. J Taiwan Otolaryngol Soc 33:86-91.
3. Ko JY, Sheen TS (1998): Reconstruction of circumferential pharyngeal defect following cancer surgery with tubed pectoralis major myocutaneous flap and interdigitating anastomosis. J Formosan Med Assoc 97:360-363.
4. Ko JY, Sheen TS (1998): Intraluminal Involvement of the Trachea by Thyroid Cancer. J Formos Med Assoc 97:289-291.
5. Ko JY, Lui LT, Sheen TS, Lou PJ, Hsu MM (1998): Increased Mutagen Sensitivity in Patients With Head and Neck Cancer is Less Pronounced in Patients With Nasopharyngeal Carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124:578-581.
6. Ko JY, Sheen TS, Hsu MM, Lui LT (1998): Familial clustering of nasopharyngeal carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 118:736-737.
7. Chen YJ, Ko JY, Chen PJ, Shu CH, Hsu MT, Tsai SF, Lin CH (1999): Chromosomal aberrations in nasopharyngeal carcinoma analyzed by comparative genomic hybridization. Genes Chromosomes Cancer 25:169-175.
8. Ko JY, Sheen TS, Hsu MM (2000): Herpes zoster oticus treated with acyclovir and prednisolone: Clinical manifestations and analysis of prognostic factors. Clin Otolaryngol 25:139-142.
9. Ko JY, Lee TC, Hsiao CF, Lin GL, Yen SH, Chen KY, Hsiung CA, Chen PJ, Hsu MM, Jou YS: Definition of three minimal deleted regions by comprehensive allelotyping and mutational screening of *FHIT*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *p19<sup>ARF</sup>* genes in nasopharyngeal carcinoma. Cancer 2002;94:1987-1996.