

鼻咽癌的基因變化

癌症是一種基因疾病，就像大部分的癌症，鼻咽癌也因很多步驟的基因變化累積而形成，其中包括致癌基因的活化及抑癌基因的去活化等。要解開致癌之謎的第一步，首先要了解癌症的基因產生何種變化，然後再縮小範圍，針對有問題的基因，進一步深入分析。致癌基因的活化會表現出基因增加的現象；抑癌基因的去活化，可因基因缺失所致，因此看一種癌症基因的增加與減少，可推測那些致癌基因及抑癌基因參與致癌過程。比較型基因組雜交法(comparative genomic hybridization, CGH)在一次的實驗，可得知 23 對染色體上基因的增減情形，提供一個整體，比較大範圍的基因變化全貌。

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[1,2]。

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 RB1，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[3]。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；12p13 有 CCND2 和 TEL；12p 有 PTHLH(parathyroid hormone-related polypeptide)；12q 有 CDK4、INT1、MDM2；8q24 有 c-MYC 等一些致癌基因。

為了進一步了解鼻咽癌細胞染色體上更小區段的缺失，藉助看失異合性(loss of heterozygosity, 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)，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，如果兩同源染色體之一有一段基因缺失，謂之失異合性。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，尤其 9p21-22 有純合性缺失(homozygous deletion) [4]。後來有附上不同顏色的螢光標記，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，電腦紀錄、判讀，可比傳統同位素法快上幾十倍，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[5]。

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。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 GRA 的 transition；在 CNE-1, CNE-2 相同位置的第二個鹼基發生 ARC 的 transversion，結果導致 mRNA 撿接失誤，漏掉 exon 2 而出現異常、較短的 mRNA[6]。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[7]。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)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。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[8]。

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(homozygous c2 variant)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[9]。遺傳因素可以解釋鼻咽癌致病原因的 50%以上，鼻咽癌病患的一等親，罹患鼻咽癌的危險性是一般人的 19.2 倍。這種遺傳因素也表現在鼻咽癌高危險區的正常人鼻咽表皮，香港廣東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的正常鼻咽表皮細胞 3p 染色體，比較容易受到破壞，而導致較高比率出現鼻咽癌[10]。

推薦讀物

1. Chen YJ, Ko JY, Chen PJ, et al: Chromosomal aberrations in nasopharyngeal carcinoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:169-75.
2. Hui ABY, Lo KW, Leung SF, et al: Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridisation. *Int J cancer* 1999;82:498-503.
3. Sun Y, Hildesheim A, Li H, et al: No point mutation but a codon 31serRarg

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* 1995;4:261-7.

4. Huang DP, Lo KW, van Hasselt CA, et al: A region of homozygous deletion on chromosome 9p21-22 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4003-6.
5. Lo KW, Teo PML, Hui ABY, et al: High resolution allelotyping of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:3348-53.
6. Lo KW, Huang DP, Lau KM: p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2039-43.
7. Lo KW, Cheung ST, Leung SF, et al: Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:2721-5.
8. Cheng Y, Poulos N, Lung ML, et al: Functional evidence for a nasopharyngeal carcinoma tumor suppressor gene that maps at chromosome 2p21.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3042-7.
9. Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, et al: CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1207-12.
10. Chan ASC, To KF, Lo KW, et al: High frequency of chromosome 3p deletion in histologically normal nasopharyngeal epithelia from southern Chinese. *Cancer Res* 2000;60:5365-70.