

中國醫藥大學  
醫學研究所  
碩士學位論文

臺灣地區口腔癌易感性與雙股斷裂修  
補基因關聯性之探究

Study of Associations of Double Strand Break Genes  
with Oral Cancer Susceptibility in Taiwanese

指導教授：蔡銘修教授

研究生：許嘉方

中華民國九十七年七月

## 中文摘要

Non-homologous end joining (NHEJ)相關基因，對於維持人體基因體的穩定，扮演了相當重要的角色。其中許多的基因，例如 *XRCC4*、*Ku70* 及 *Ku80* 等，由於其功能對 DNA 修復相當重要，因此當這些基因的表現受到影響，或是功能不足時，整個基因體的穩定性便會大打折扣，從而增加癌症的發生率。而位於 NHEJ 相關基因上的單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)位點已經多篇文獻提出與許多不同的人類癌症分別具有關聯性。綜上可見這些基因的位點其多型性的不同，確實會影響到基因的功能，進而促使癌症發生。

口腔癌為國人常見之疾病，而雖然 NHEJ 相關基因之 SNP 與口腔癌有明顯關聯性之研究，已有數篇相關的論文於國外的族群發表，其結果固然可供參考，但未必與國人之情形完全相同，因此，進行以國內族群為研究主體的相關研究，確實有其必要性與急迫性。

文獻中指出，部分國人因為有嚼食檳榔的習慣，導致口腔癌的發生機率增加。本研究即探討國人身上 NHEJ 相關基因中 *Ku80* 之多型性與口腔癌發生之關聯性，我們發現 *Ku80* G-1401T rs828907 位點的基因型，以卡方試驗分析，比較口腔癌病患組與正常對照組之對偶基因頻率其  $p$  value 為 0.038303 ( $< 0.05$ )，具有顯著差異；其中 G/T 及 T/T 兩種基因型在口腔癌病患組當中所佔的比例，明顯的高出其在正常對照組中所佔的比例；體內帶有 T 型變異型的個體，在罹患口腔癌方面有較高的風險，而在有嚼食檳榔習慣的人們身上，風險更高。我們的研究對於早期的癌症基因篩檢，早期發現高危險群並及早預防等防治口腔癌的工作，將有很具潛力的貢獻。

## Abstract

Genes of non-homologous end joining (NHEJ) are very important in maintaining the stability of human genome. Some important NHEJ genes, such as *XRCC4*, *Ku70* and *Ku80*, may play important roles in DNA repair. It is also reported that the risk of cancer will increase when some of these genes do not behave their complete function or expression. The association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) on these genes of NHEJ and various cancers has already been reported by various laboratories. Therefore, the polymorphisms of the SNPs on these genes can affect the normal function of these genes, and further raise the risk of cancer.

Oral cancer, a common disease in Taiwan, is a very serious public threaten. Although the association between SNPs on *Ku80* of NHEJ and oral cancer risk has already been studied, but these reports were all foreign populations, not Taiwanese population, thus it is necessary and urgent to investigate the involved of *Ku80* polymorphisms in oral cancer.

It is popular that some of the Taiwanese have the habits of chewing betel nuts, which is reported to be closely-related to oral cancer risk. Among the SNPs we investigated in this research, we found that only the *Ku80* G-1401T rs828907 was associated with oral cancer risk ( $p=0.038303$ ), and this novel SNP of *Ku80* may be very useful in early detection and prevention of oral cancer.

## 誌 謝

從住院醫師開始臨床接觸治療口腔癌的患者，為他們戰勝癌症病魔感到高興，也常為支撐癌症苦痛至最後一刻而往生的病患傷心不捨。因此期許自己持續努力不懈，為這個每年奪走數千名國人同胞寶貴生命的疾病找出預防和治療的最好方法。

感謝學校讓我在研究所開始學習基礎研究的方法，感謝蔡銘修主任的指導，從實習醫師時在林口長庚醫院有幸跟隨蔡主任門診、開刀房及病房實習開始，主任一直是我們學習的典範，在他的帶領下才能完成這篇研究。感謝包大韞博士不厭其煩的教導我各種研究的方法和技巧，克服實驗室的各種困難。特別謝謝政力和實驗室的團隊伙伴們，時常幫我上課，和協助我實驗順利完成。謝謝家人們的支持和鼓勵，陪伴我完成學業。感謝張乃文老師、陳穆寬主任和高嘉鴻主任審閱論文，給予指正和寶貴的意見。

謝謝志願提供檢體進行研究的一千兩百位患者和民眾們，感謝你們的支持和付出，才能完成這項研究。希望後續有更多的成果和發現產生，以及愈來愈多人支持和參與合作，共同找出預防和治療口腔癌的最好方法。

## 目 錄

|               |     |
|---------------|-----|
| 中文摘要.....     | I   |
| 英文摘要.....     | II  |
| 致 謝 .....     | III |
| 目 錄 .....     | IV  |
| 表目錄 .....     | V   |
| 圖目錄 .....     | VI  |
| 前言.....       | 1   |
| 第一節 研究背景..... | 1   |
| 第二節 研究目的..... | 27  |
| 材料與方法.....    | 29  |
| 結果.....       | 41  |
| 討論.....       | 46  |
| 參考文獻.....     | 54  |

## 表目錄

|   |    |
|---|----|
| 表一 口腔癌病人及正常對照組之各項特徵.....                              | 63 |
| 表二 口腔癌病人及正常對照組之 <i>Ku80</i> 基因單一核苷酸多型性位點基因型.....      | 64 |
| 表三 口腔癌病人及正常對照組之 <i>Ku80</i> 基因單一核苷酸多型性位點對偶基因攜帶率.....  | 65 |
| 表四 口腔癌病人及正常對照組中吸煙者之 <i>Ku80</i> 基因單一核苷酸多型性位點基因型.....  | 66 |
| 表五 口腔癌病人及正常對照組中嚼檳榔者之 <i>Ku80</i> 基因單一核苷酸多型性位點基因型..... | 67 |
| 表六 口腔癌病人及正常對照組中飲酒者之 <i>Ku80</i> 基因單一核苷酸多型性位點基因型.....  | 68 |

## 圖目錄

- 圖一 *Ku80* G-1401T rs828907基因多型性的凝膠電泳圖.....69
- 圖二 *Ku80* C-319T rs11685387基因多型性的凝膠電泳圖.....70
- 圖三 *Ku80* intron19 rs9288518基因多型性的凝膠電泳圖.....71
- 圖四 *Ku80*基因之單一核苷酸多型性位點與口腔癌發生之關係.....72



## 前 言

### 第一節 研究背景

#### 口腔癌之定義與流行病學

頭頸癌(Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCC)在全球每年約有500,000的病例報導[1]，國際疾病分類代碼(ICD9CM)為A140-A149，例如口腔癌、咽喉癌、等癌症(不包含A147的鼻咽癌) [2]。根據行政院衛生署公布96年台灣地區主要死亡原因，惡性腫瘤為十大死因之首，惡性腫瘤所占死亡率為28.9%。其中口腔癌占十大惡性腫瘤中的第六位，每十萬人口死亡率為10.1人，死亡百分比為5.7%，比較民國70年每十萬人口死亡率為2.57人而80年上升到每十萬人口死亡率為4.68 人[2]，口腔癌在台灣地區發生率與死亡率有明顯逐年上升的趨勢。

近年來台灣地區十大癌症中口腔癌的發生率和死亡率正在逐年增加中，民國八十三年尚未進入十大癌症排名，到了八十四年的死亡人數為902人，攀升至癌症十大死因排名第七位；民國八十五年的死亡人數增加為1042人，排名再晉升至第五位，其中90% 均為男性；而且估計每年新增的口腔癌患者在1500人以上，因此，口腔癌越來越不容忽視。

在1988 年美國癌症聯合委員會(AJCC)以及國際抗癌聯合會(UICC)制定的口腔癌發生部位，包括唇、舌、口底、頰粘膜、牙齦、硬顎等，以上部位所形成的口腔癌約有90%都是鱗狀上皮細胞癌，只有少部分會發展成腺癌；台灣地區則



以舌癌、頰粘膜癌居多。口腔癌早期症狀少有痛感，唾液或痰液中摻有血絲，白斑或紅斑易被患者忽略；繼而發展成有痛感、傷口持久不癒達六個月之久的進行性癌症。

在口腔粘膜下纖維化 (Oral submucosal fibrosis, OSF)會發生粘膜發炎、慢性的纖維化，近上皮層堆積缺乏彈性的纖維組織，伴有肌肉退化現象；粘膜因失去彈性，而緊貼著牙齒產生摩擦，導致慢性潰瘍和繼發性感染；發生這種口腔粘膜下纖維化三分之一的患者可能轉變成口腔癌[3]，所以OSF為一種癌前病灶，在癌症發展上具有相當高的危險性[4]。

舌鱗狀上皮細胞癌，多發生於中、老年男性之舌頭側緣的，臨床上多是無痛腫塊或潰瘍，邊緣微隆起或深入浸潤舌頭深部組織而固著，使舌部運動困難、吞嚥及飲食不便。舌癌因舌部組織特性常浸潤較深層組織，且較早發生轉移，預後較差[5]。

## 口腔癌之常見病變

### 一、口腔鱗狀上皮細胞癌

口腔癌的臨床表徵是較難癒合的潰瘍或突出的潰爛硬塊，常伴有轉移的頸部淋巴結。口腔癌的病理種類有鱗狀上皮細胞癌(squamous cell carcinoma)、疣狀癌(verrucous carcinoma)、腺樣囊狀癌(adenoid cystic carcinoma)、黏液表皮樣癌

(mucoepidermoid carcinoma)等，其中有95%以上是口腔鱗狀上皮細胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)。近年來台灣地區口腔癌的死亡率及發生率持續上升，自民國八十二年佔男性的第十五大癌症死亡原因，至今排名從沒下降過，根據民國九十六年衛生署資料顯示，國人口腔癌之發生率為全人口癌症的第六名，男性癌症的第四名，青壯年男性癌症(25~44歲)的第一名，高居全世界之第三名。台灣地區之口腔鱗狀細胞癌以舌癌和頰黏膜癌佔大多數，其發生和嚼食檳榔、吸煙、喝酒等個人習慣息息相關，尤其以南部地區為甚。依據流行病學的統計，發現沒有吸煙、喝酒以及嚼食檳榔等三種習慣，卻罹患口腔癌之患者，佔全部口腔癌患者之7.6%，平均罹患年齡為60歲。而在嚼食檳榔習慣之患者，其罹患口腔癌的平均年齡降至50歲；有嚼食檳榔習慣之患者，其五年存活率也較沒有嚼食檳榔習慣之患者差。嚼食檳榔與口腔鱗狀上皮細胞癌關係密切[6]，然而多數的檳榔嚼食者往往認為口腔癌不可能發生在自己身上，而喪失了防治的先機。近年來，口腔鱗狀上皮細胞癌的發生率和死亡率有逐漸增加的趨勢，外科技術，化學藥物及放射線治療都有長足的進步，但口腔鱗狀上皮細胞癌的存活率，卻仍未見改善。相對於所有的癌症，口腔鱗狀細胞癌的預後是不好的。根據統計患者治療後五年存活率平均36.1%，與TNM 臨床分期有密切關係，第一期為72%，到第四期只有11.8%[7]，故早期癌症的發現與治療是目前改善預後較實際的做法。綜上所述，對於口腔癌之診斷及其癌化機轉更進一步的瞭解，不但重要而且

迫切。

## 二、口腔癌前病變 (oral precancerous lesion)

根據以往流行病學的研究發現，許多口腔黏膜疾病已被視為是口腔癌的癌前病變；而在印度、南非、巴布亞新幾內亞以及台灣等地居民有嚼食檳榔習慣的國家，一些口腔黏膜病變如口腔黏膜下纖維化(oral submucous fibrosis)、口腔白斑症 (oral leukoplakia)，以及疣狀增生(verrucous hyperplasia)，其發生率較其他國家或地區明顯高出許多。在美國Rochester由Bouquot等人[8]進行的研究發現，有36%的口腔鱗狀細胞癌是由癌前病變發展而來的。而在印度鄉下，則有90%以上的口腔鱗狀細胞癌是由癌前病變發展而來的[9]，故對於口腔癌前病變的判斷極為重要。正常的口腔黏膜一般呈現表面光滑柔軟的粉紅色，然而發生病變時則口腔黏膜會呈現白色、紅色或是紅白相間的顏色，黏膜表面也會變得粗糙且失去彈性。組織病理學的層次來看，鱗狀細胞癌之癌前病變是指變異細胞侷限於上皮層，病理上稱上皮變異(epithelial dysplasia)。上皮變異是指上皮細胞有不正常的型態變化，這些細胞與惡性細胞變化類似，但沒有超過基底細胞層(basal layer)，上皮變異之臨床病變可能是癌前病變如口腔白斑症、紅斑症(erythroplakia)等。其特徵包括基底細胞增生(basal cell hyperplasia)，細胞核變大、核染色質濃染(hyperchromatism)，細胞之聚集與排列異常(loss of cohesiveness and polarity)，在

表層及中間層上皮細胞出現有絲分裂，異常角質化(dyskeratosis)及退行性變化(anaplasia)或變異與正常上皮間之變化有明顯的界線。當病理診斷變異為癌前變異時，並非所有癌前病變皆會轉變成惡性腫瘤，輕度變異(mild dysplasia)有時可以自動痊癒。不過有些病變在切片診斷或治療時已全部被切除，因此之後觀察到的惡性潛能未必準確，可能低估。有些臨床表徵也是低估惡性潛能的指標，譬如口底、舌側之病變，未必觀察到變異但惡性潛能卻很高。再者，有些癌前病變的上皮萎縮，要從層數稀少的上皮看出細微的細胞病理變化不容易。加上口腔域癌化(field cancerization)的可能，當細胞累積足夠的基因變異因而獲得足夠的選擇優勢 (selective advantages) [10]後形成癌症，因此高危險群之篩檢甚為重要。上皮變異之分級一般以變異細胞在上皮層內侵犯的比例大小分為輕度，中度、重度(或再加上原位癌)三至四級。Lumerman等學者[11]研究了308 個變異的病例，認為疣狀增生上皮，即使上皮變異不明顯，惡性潛能亦很高(28%)，故將其增列為第五級。

### **口腔白斑症 (oral leukoplakia)**

口腔白斑症是臨床上最常見的口腔癌前病變，為以白色為主的口腔黏膜病變，無法歸類於其它有明顯致病原因的口腔疾病，病理報告約10-20%具有上皮變異，臨床研究發現約有3-6%的口腔白斑症轉變為惡性腫瘤[12]，通常在發現白

斑後2-4年發生口腔癌，但也可以於在更久後發生惡性變化。臨床分類主要分為均質白斑與非均質白斑兩大類及四期，其中又有許多次分類，各有不同的惡性潛能。概括言之，以非均質白斑、紅色病變比例高者惡性潛能較高，臨床上對白斑症之描述用過相當多的名詞，而此一疾病有許多灰色地帶。增生性疣狀白斑症 (proliferative verrucous leukoplakia) 一開始亦是簡單扁平的上皮角化病變，但其會持續向外生長，呈現疣狀外觀，會有一個很像疣狀癌 (verrucous carcinoma) 時期，最後則幾乎都會有上皮變異，轉變為口腔鱗狀細胞癌。台灣檳榔族常見之口腔疣狀白斑 (oral verrucous leukoplakia)，則有一種特殊之口腔白斑症族群或稱之口腔疣狀增生 (oral verrucous hyperplasia) 與增生性疣狀白斑症相當類似[13]。根據Chang等人的研究，53例中只有7例在病理切片上出現上皮變異，但在平均追蹤三年半後發現有42%形成口腔癌，26%於切除後復發。利用癌前病變中基因的變異作為生物標誌，應用在臨床篩檢及預測口腔癌前病變惡性潛能是一個可行的方法。口腔疣狀白斑症之研究發現p53蛋白(51%)與p21蛋白(75%)之過度表現與轉變成癌之機率及復發率有明顯相關[13]，近年發現染色體套數異常可作為癌前病變轉癌化之預測指標，為早期篩檢重要的發現，惟仍須以切片檢體進行，尚未能臻致非侵襲性(non-invasive)取樣之層次[14]。

#### **口腔紅斑症 (erythroplasia)**



紅斑症與白斑症類似，但較少見之；在組織病理學上，上皮萎縮或增生，缺乏角質化，結締組織處之血管清晰可見，故視之呈紅色。紅斑症之惡性潛能比白斑症高許多，屬於晚期之癌前病變。

## 口腔癌之研究現況

有關口腔癌的環境致癌因子，許多流行病學研究指出目前比較確定的口腔癌環境致癌因子有喝酒、抽煙及嚼食檳榔等生活習慣 [6, 15-17]，且其彼此之間有加成性的效果。亦即當某人同時具有喝酒、抽煙、嚼食檳榔的習慣時，其罹患口腔癌的風險比一般人將增加許多。台灣地區的嚼食檳榔者，有將近九成同時具有吸菸之習慣。環境致癌因子一般認為會透過以下的機制來引導癌細胞的發生：1. 致癌因子可能會抑制抑癌基因的功能，甚至生成，導致細胞不受控制任意生長，於是發展成癌細胞。2. 致癌因子可能會造成DNA 的受損，因而使致癌因子活化、抑癌因子失去功能，造成細胞週期不正常的分裂增生，導致惡性腫瘤的生成 [18]。生活習慣與口腔癌的發生有一定的相關性，在印度、東南亞(包括台灣)、南非等地區，嚼食檳榔的習慣非常風行[6]。

以地區來分，發現致癌因子暴露的不同，造成口腔癌發生的機率與產生病變的部位皆不相同。在印度口腔癌發生率佔癌症中的40%為世界口腔癌發生率最高的國家[1]，主要發生的部位在舌頭與口腔黏膜，而印度人嚼食檳榔時所添加的

菸草與嚼食檳榔種子部分，被認為是可能的致癌因子[19, 20]。西方國家頭頸癌發生比例只佔2~4%，發生的部位主要為口底(mouth floor)，可能的環境致癌因子是雪茄與喝酒[21]。

台灣口腔癌佔所有惡性腫瘤之盛行率約 10%，在十大癌症中佔第六位，男性佔第四位，發生的部位在舌頭、口腔頰膜、牙齦，可能的環境致癌因子為嚼食檳榔果實部分、抽煙(香菸)及喝酒。1995 年針對台灣地區口腔癌患者的流行病學調查發現：同時具有嚼食檳榔、抽煙、喝酒等三種習慣者，其罹患口腔癌的危險機率是一般正常人的 123 倍，而單一嚼食檳榔的危險機率 (28 倍) 又比抽煙 (18 倍)、喝酒(10 倍)者為高[6]。以酒精和抽煙對於口腔上皮細胞型態上的研究，發現會導致細胞皺縮，而這種局部的毒性作用，是不具特異性的[22]。抽煙所產生的多環芳香性碳水化合物被認為是主要的前驅致癌因子。

台灣地區據估計大約有280萬嚼食檳榔的人，約佔總人口的13.33%。在全世界，具估計則約有二至六億人口有習慣嚼食檳榔與其相關產品。在台灣，嚼食檳榔的歷史可以追溯至數百甚至數千年前的原住民族群，即存在有嚼食檳榔的習慣。而漢人原本也有嚼食檳榔的習慣存在，但主要以海南島與湖南省居民較為普遍。隨著漢人移民來台之後，入境隨俗地檳榔也隨之成為入藥、社交、送禮等的物品之一。

除了在中國之外，嚼食檳榔在印度及東南亞某些地區也具有相當久遠的歷

史，普遍存在於社交場合中。根據報告指出，曾有或現有嚼食檳榔塊習慣的地區包括：孟加拉、緬甸、中國南部、高棉、印度、印尼、寮國、馬來西亞、尼泊爾、新不列顛、新愛爾蘭、巴基斯坦、紐幾內亞、菲律賓、新加坡、斯里蘭卡、台灣、泰國及越南，另外居住在斐濟、肯亞、模里西斯、南非、烏干達及坦尚尼亞的東印度移民社區中的居民也存有此習慣。

嚼食檳榔的習慣雖存在於上述地區的居民，然檳榔的嚼食方法與搭配的添加物，因著不同地區的人文背景與發展卻有著相當大的差異，食用的量也有所不同。光在印度地區的統計，即有22種不同嚼食檳榔的方式，雖在上述這些國家或區域中嚼食檳榔的方式或多或少都存著些許的差異，不過大略地依嚼食方式做分類，主要可以劃分為嚼食檳榔塊時添加菸草，與嚼食檳榔塊時不添加菸草等兩大類型。以地理區域大致來說，印度，巴基斯坦，斯里蘭卡等地之居民，多以嚼食菸草檳榔塊為主，而紐幾內亞，馬來西亞與台灣等地之居民，則是以嚼食不加菸草的檳榔塊為主。東南亞等地區喜食用已成熟檳榔果實中之果仁(Ripe areca nut)、煙草、熟石灰、香料和荖葉等一起包裹成大小約可放入口內之三角形包。

在台灣地區檳榔塊的特徵為新鮮未成熟的檳榔果實及其添加物所混合而成的檳榔嚼塊，不混合煙草，民眾嚼食檳榔的習慣可致分為三種。第一種是將整顆新鮮未成熟的檳榔中間剖開後內夾入切塊的荖花(Piper betel inflorescence)及少許紅灰，稱為荖花檳榔塊，俗稱菁仔；第二種則是將荖葉(Piper betel leaf)塗抹白灰後



包裹著整顆新鮮檳榔，市售俗稱包葉檳榔塊；第三種可稱為硬荖藤檳榔塊，其作法是以整顆新鮮檳榔中間剖開塗抹白灰後再夾入切塊的硬荖藤，嚼食此檳榔塊者大都是原住民，他們將樹枝的部位特稱為荖藤。比較國內外口腔癌環境致癌因子、發生率、好發的部位皆不相同，因此推測所影響的分子層面也有所不同。

檳榔子為整個檳榔嚼塊中最主要的成份。檳榔子具有止痢、驅蟲、縮瞳和興奮等效果，其主要成分包括多酚類化合物(Polyphenol)、生物鹼、粗纖維、脂肪、多醣類和鐵離子等等。多酚類化合物是檳榔子中含量最多的成份，隨著檳榔種類、成熟度、採收季節與是否加工處理過，含量會有所差異，有7-55% 的差異之多(IARC, 1985)。檳榔子中的Polyphenol 成份大多以Catechin 或Epicatechin 為基本骨架再結合(Conjugate)為Procyanidin B-2、Procyanidin B-7 和 Epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin-(4 $\beta$ -8)-catechin，聚合後的Polyphenol 分子量增加，若分子量介在500 至5000 左右則通稱為單寧(Tannin)，此為檳榔澀味的主要來源。在生物鹼方面，主要為Arecoline、Arecaidine、Guvacine 和Guvacoline，在檳榔果實、種子和水萃取物中的含量約為0.1-1% 之間[23-26]。台灣檳榔果實亦含有小部份金屬元素，例如：鐵、鎂及銅離子。檳榔子中多酚類成份為主要的澀味來源，檳榔販者為了消除此澀味，通常會在檳榔嚼塊中添加石灰。一般市售檳榔添加的石灰又可分為紅灰與白灰，兩者的差異在於紅灰有加入甘味料(Sweeteners)、調味品(condiments)或香料(flavorings)等各家偏方。石灰本身不具致突變性，但石灰會使

口腔環境變成鹼性；在鹼性環境中檳榔塊中的一些成份會釋放出一些氧化自由基 (oxygen free radical)，而近年來自由基被認為在檳榔致癌機轉中扮演重要的角色 [27, 28]。

## DNA 修補基因

### 簡介

生物體長期地暴露在會傷害 DNA 的內生性與外生性的物質下，根據統計，人體每個細胞每天大約會發生 10,000 個 DNA 損害[29]，如果 DNA 的傷害不加以修復，將會導致突變、細胞死亡、不正常的細胞增生甚至於癌症，為維持基因體的穩定，生物體內都有正常的 DNA 修補機制以修復特定的傷害，於 DNA 修補機制中維持核酸的結構穩定性，取決於核酸損壞後的確認、核酸複製、基因之轉錄及細胞週期之調控等過程。此機制主要包括修復小範圍 DNA 傷害的鹼基切除修補 (base excision repair, BER)、修復大範圍 DNA 傷害的核苷酸切除修補 (nucleotide excision repair, NER)、修復序列配對異常的配對錯誤修補 (mismatch repair, MMR) 及雙股斷裂修補 (double-strand break repair, DSBR) [30-33]。研究指出 DNA 修補基因的基因多型性可能會改變蛋白質的作用以及個人的修補能力，進而影響對癌症的易感受性[30]。

## DNA修補基因與疾病之關聯

在早年針對DNA修補系統的研究中，就常發現，此系統中的基因一旦受損，常常會導致許多嚴重的病變與缺陷，且往往是致命的。這樣的事實使我們了解DNA修補對於維持生命的重要。

有許多先天遺傳疾病，在經過詳細確認病因之後，常常發現皆是肇因於DNA修補系統的微小缺陷，雖然這些缺陷相當微小，但是常會導致明顯的病變。因此我們可以推斷，較微小的DNA修補系統缺陷，不見得會造成個體的死亡，但是往往會造成疾病發生或是功能上的缺損。

DNA修補機制已被普遍地認為與癌症的發生具有高度關聯性，有許多的研究指出，效率較差的DNA修補系統，常常會使得擁有者罹患癌症的機率大為增加。這些研究，包含了體內與體外的實驗，在這些結果當中，我們不難發現，DNA傷害的存在與累積，確實是體內發生癌症的一項關鍵因素，當然，減少這些DNA傷害的產生，不失為降低罹癌風險的一個好方法，不過以目前人們的生活環境而言，想要遠離所有已知的外源性致癌因子，已有相當的困難度。再加上有許多能夠造成DNA損傷的物質，還沒有被人們確認出來，也無從避免起。因此，既然DNA損傷是無法避免的，如何有效率的移除這些傷害，應為降低罹癌風險較合理的思考方向。

於先前的研究當中，我們已經很清楚地瞭解到，口腔癌的發生與一些環境危

險因子有著密不可分的關係，這些環境危險因子包括了菸、酒及檳榔。而這三項具有高度致癌風險的致癌物，同時也都具有造成大量DNA損傷的能力，這與我們先前所提到，DNA損傷與癌症發生的關係不謀而合。尤其在台灣地區，檳榔與口腔癌的關係格外密切，而檳榔含有大量的自由基，自由基能在口腔粘膜細胞當中，引起大量的DNA損傷，而自由基又有什麼特性呢？

ROS 包括 $O_2^-$  (Superoxide anion)、 $H_2O_2$  (Hydrogen peroxide)、 $OH^\cdot$  (Hydroxy radical)、 $ROO^\cdot$  (Organic hydro-peroxide)和 $NO^\cdot$  (Nitric oxide)等，含有不成對電子的原子或分子，位處於能階較高、不穩定的狀態，能自發性隨機將一部份的能量傳給鄰近原子或分子後，回到較穩定的低能階狀態下。在自由基一連串的作用下，會改變其附近的微環境，造成特定程度的傷害。由於這些化合物因含有氧原子且具有很強的活性，又稱為活性氧化族群(reactive oxygen species, ROS)，造成的傷害則稱為氧化性傷害(oxidative damage) [34]細胞內的過渡金屬元素，如：銅或鐵離子，在ROS的產生過程中扮演重要的角色。 $Fe^{3+}$ 或 $Cu^{2+}$ 受到 $O_2^-$ 攻擊後分別會被還原成 $Fe^{2+}$ 或 $Cu^+$ ，若再與 $H_2O_2$  反應，會形成活性最強的 $OH^\cdot$ ，造成更嚴重的氧化性傷害。

細胞內有許多抵抗ROS的防禦性系統，包括superoxide dismutase (SOD)、catalase、glutathione system、vitamin E、ascorbate 和urate等[34, 35]。但在持續不斷的氧化性壓力下，超過身體防禦的負荷能力時，ROS即會與細胞內正常分子，

如：lipids、proteins 和DNA等接觸與作用，而造成氧化性傷害。文獻顯示，許多人類疾病的產生，如：動脈粥狀硬化(atherosclerosis)、類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)、神經退化疾病、老化甚至於癌症的產生都和ROS 密切相關。

1984 年Rosin 等學者即已提出植物所含的多酚類成份，例如：pyrogallol、gallic acid、resorcinol、catechin 和檳榔萃取物(ripe areca nut extracts, rANE)或單寧酸萃取成份在酸鹼值大於9時會誘發釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)之D7 菌種產生mitotic conversion，造成基因毒性，他們並猜測多酚類化合物在鹼性環境下會快速的自動過氧化而釋放出許多自由基(Rosin, 1984)。另一方面，Nair等學者在1987年利用化學冷光法直接測出rANE 在pH 大於9.5 時會釋放出 $H_2O_2$ 、 $O_2^-$ 等自由基。而過渡金屬會參與在鹼性環境下多酚類成份之自動過氧化，一般而言， $Fe^{2+}$ 和 $Cu^+$ 具有促進作用，而 $Mg^{2+}$ 則會抑制其作用。在體外實驗中，將rANE 在鹼性環境或在 $Fe^{3+}$ 參與下，可偵測到DNA氧化性傷害指標8-OH dG 的增加，這表示rANE所產生的ROS的確會對細胞的DNA造成傷害[28]。而在體內實驗，將rANE混合塗抹在倉鼠的囊頰黏膜5天後，則組織中具有微核的細胞(micronucleated cells)的比例有明顯增加的現象[36]。綜合以上結果，認為檳榔嚼塊混合石灰後會釋放出ROS，並進一步對細胞產生毒性。

由此可知，台灣地區的口腔癌，之所以和檳榔有高度的相關性，很可能就是肇因於檳榔在口腔中所釋放的大量自由基，這些自由基在口腔周圍細胞當中引發



了大量的DNA損傷。此時，若是體內DNA修補機能相當健全的人，便能在損傷產生後短暫的時間內，將這些由自由基造成的損傷移除並修補完成，這些DNA損傷就不會繼續堆積在細胞當中。而若是DNA修補系統功能較差的人們，其修補功能雖然沒有嚴重的缺失造成死亡或是較明顯的急性疾病，在此情形下，也許也能夠將體內大部分的DNA損傷修復，但是當此系統遭遇大量DNA損傷的挑戰時，便會出現應接不暇的情形，而無法將所有的損傷都在短時間內修復。這些沒被完全修復或移除的DNA損傷，將會開始堆積在細胞內，進而引發細胞凋亡或是癌症。由此可知，對於台灣地區的口腔癌來說，DNA修補系統的強弱，應該是在癌症發生的過程中，扮演相當關鍵的角色。

## BER之修補

BER 酵素去除 DNA 受損的部分，然後利用相對立的一股當作模板填補失去的鹼基。BER 修補系統包括多種酵素，這些酵素逐步發揮功能，例如：當較小範圍的 DNA 鹼基鍵結物形成時（通常是氧化的鹼基），DNA 糖解酵素（glycosylases）催化切除功能，形成一個無鹼基核苷酸（abasic site，AP site）。然後這些無鹼基核苷酸被無嘌呤或無嘧啶的內切酵素（endonuclease）進行修飾，使 DNA 的 3'端和 5'端形成無鹼基核苷酸。這些形成的缺口接著被 DNA 聚合酵素（polymerase）所填補，剩下的 DNA 缺口則是被 DNA 連接酵素（ligase）連

接完成。

## NER 之修補

NER 酵素負責去除像 UV 光化學產物（胸腺嘧啶二聚物）和巨大的化學鍵結物（如 benzo[a]pyrene diolepoxide-guanine adducts）巨大的 DNA 損傷。使 DNA 螺旋體變形修補的 NER，其過程與 BER 相似，有四個主要步驟，包括 DNA 損傷之辨識（damagerecognition）、切除（incision）、缺口填補（gap-filling）及連接（ligation）等等。但是比 BER 複雜的是，NER 驅動這些過程的切除酵素（excinuclease）至少有 16 種蛋白質。NER 系統的缺失與人類遺傳疾病色素性乾皮症（xeroderma pigmentation, XP）有關，患者常有光敏感性、易得癌症體質和神經退化（neurological degeneration）等特徵。

## DSB之修補

不同的 DNA 損傷會引發不同的 DNA 修復 (DNA repair) 機轉，其中用來修復由外界的游離輻射、化學致癌物或內生性自由基所造成的 DNA 雙股斷裂之修復路徑有兩種，一個為同源性重組路徑 (homologous recombination pathway; HR)，另一個為非同源性末端黏合路徑(non-homologous end joining pathway; NHEJ)。

當 DNA 雙股斷裂發生時，細胞會啟動 checkpoint 使細胞週期 (cell cycle) 停止，並且活化 DNA 修復基因，讓細胞可以進行 DNA 的修復。DNA 雙股斷裂是 DNA 損傷中最嚴重的一種，若細胞中的 DNA 損傷無法被正確修復，細胞便會走向死亡 (apoptosis)；如果細胞無法進行 DNA 修復而同時 checkpoint 也失去功用，DNA 損傷便會累積在細胞中，容易造成突變 (mutation)、染色體重組及基因體的不穩定 (genomic instability)，更進一步可能會導致細胞走向癌化 (carcinogenesis) 的過程。

在同源性重組路徑中，ATM 會感測 DNA 損傷的存在而活化其下游與 DNA 修復及細胞週期控制有關的蛋白質。首先，RAD50/MRE11/NBS1 complex 會切割 DNA 斷裂處的 3'端，使其尾端形成單股 DNA，以利 RAD52 辨識。接著吸引 DNA 結合蛋白 (DNA binding protein) 和複製蛋白 A (replication protein A; APA) 前來穩定單股 DNA，幫助 RAD51 結合至單股 DNA 上。此時，BRCA1/2、RAD51C/D、RAD54 及 XRCC2/3 等蛋白質會共同調控 RAD51 的活性，協助 RAD51 尋找同源染色體 (homologous chromosome) 作為修復斷裂處的模板 (template)。最後由 DNA 聚合酵素 (DNA polymerase) 及 DNA 接合酵素 (DNA ligase) 完成修復並使 DNA 回復原狀。[37]

非同源性末端黏合路徑受到 ATM 活化後，Ku70/Ku80 異合雙體 (heterodimer) 會與 DNA 斷裂處末端結合並吸引 DNA-PKcs (DNA-dependent



protein kinase catalytic subunit) 前來。接著 XRCC4 和 ligase IV 會將斷裂處直接黏合，RAD50/MRE11/ NBS1 complex 也會參與在此過程中。此外，免疫細胞進行 V(D)J 基因重組也是經由此路徑。和同源性重組路徑最大之不同點，為非同源性末端黏合路徑不需模板，直接將斷裂處進行接合，導致 DNA 序列的缺失 (deletion)[38]。

早期認為由於高等生物基因體龐大，進行同源性重組路徑較耗費時力，因此細胞主要以非同源性末端黏合路徑進行雙股 DNA 斷裂之修復。但是近期的研究認為，細胞選擇修復的方式與細胞週期有關。若是 DNA 雙股斷裂發生在 S 期進入 G2 期，因為有同源染色體的存在，細胞較易選擇同源性重組路徑進行修復；若 DNA 雙股斷裂發生在 G1 期，則以非同源性末端黏合路徑為主[38, 39]。

當此 DSB 累積在細胞當中，很有可能引起細胞凋亡，若是未導致細胞死亡，則可能使細胞癌化，進而引起癌症。而此類傷害的修復，主要是由兩條路徑負責，分別是同源性重組路徑與非同源性末端黏合路徑這兩條路徑，各自負責同源性及非同源性的 DSB 傷害修復。

## NHEJ 簡介

在 NHEJ 系統當中，有幾個重要基因參與其中，分別為 *DNA-PKcs*、*LIG4*、*XRCC4*、*DCLRE1C*、*Ku70* 及 *Ku80*。這些基因在整個修補過程各自扮演重要的角

色，尤其是其中的XRCC4，已被多次證實與癌症的發生具有高度的關連性，在近年來針對此基因與癌症關聯性進行的研究當中，研究人員已經獲得了相當豐碩的成果，在乳癌、口腔癌、胃癌等癌症上，都已經見到顯著的結果[40-42]。這些研究乃是針對XRCC4基因上的單一核苷酸多型性(Single nucleotide polymorphism, SNP)位點進行探討，在經過以中台灣地區癌症病人以及正常對照組做為實驗檢體，進行一連串的分析之後，其XRCC4基因上，存在著一些與癌症發生相關的單一核苷酸多型性位點，這些在不同癌症上呈現顯著相關的位點，彼此並不相同，但是皆位於XRCC4基因上。這樣的結果使我們可以去思考，是否小如單一核苷酸多型性的不同，便足以影響此XRCC4基因的功能，進而干擾NHEJ路徑的運作，甚至增加罹患癌症的機率。另一方面，我們也可以藉由這些研究，了解NHEJ修補系統及XRCC4基因在維持基因體穩定上的重要性，並確認NHEJ系統及所涉及的基因，是否能夠完全的發揮功能，在不同器官或部位的癌症發生上，皆扮演了相當關鍵的角色。

NHEJ系統當中的Ku80與Ku70會形成稱為Ku的複合體，從而引導整個修補過程的進行。Ku70、Ku80與DNA-PKcs是當細胞偵測到DNA雙股斷裂發生後最先開始參與發生作用的基因，Ku及DNA-PKcs在穩定基因體末端架構上伴演重要角色。Ku及DNA-PKcs基因缺失之轉殖鼠細胞呈現染色體末端異常結合形態、縮短染色體長度、加速細胞老化過程、且該動物體易罹患腫瘤病變。實驗證明Ku與

染色體末端結合蛋白TRF1具功能性密切交互作用，藉此TRF1/Ku蛋白質體間直接結合，藉以調節染色體末端結構穩定。*Ku70*已被證實與口腔癌及膀胱癌的發生，具有顯著的關聯性[43, 44]。在這些關聯性的研究當中，其中一篇的研究人員發現，其中一個位於*Ku70*基因上的單一核苷酸位點，其基因型與中國地區人們罹患膀胱癌的風險呈現顯著相關[43]。另一篇則是針對中台灣地區口腔癌病人以及正常對照組做為實驗檢體，同樣的，也證明了其顯著關聯性[44]。而另一篇相關的研究，則是以中台灣地區眼醫疾病病人作為研究對象，此疾病雖然不算是典型的癌症，但亦是一種組織異常增生性的疾病，作者亦在研究中發現，*Ku70*的單一核苷酸位點之基因型，與疾病的發生呈現高度相關。這樣的研究使我們發現NHEJ當中許多基因，其位點的基因型，都足以影響癌症的發生。

*Ku80*基因目前並無人針對其進行單一核苷酸位點與癌症關聯性方面的研究，但是他對於癌症發生上的重要性，已經有許多文獻可以證實。在2008年一項針對非小細胞性肺癌所作的研究中發現，*Ku80*在非小細胞性肺癌病人的體內，會有不同的表現情形[45]。基於在其他NHEJ路徑相關基因上的研究所觀察到的結果，相信*Ku80*的單一核苷酸位點與癌症應該也有一定的關聯，不過要發現此關聯性則還需要更多的研究。

## 單一核苷酸多型性簡介

1990 年由美國國家衛生院開始執行人類基因組計畫 (human genome project)，目的在於解開人類基因圖譜之謎，以促進整個生物科技及醫學領域的發展，整個計畫預計於 2005 年完成。隨著生物技術的迅速發展美國及英國領導人於 2000 年六月提前宣布人類 90% 以上的 DNA 序列草圖已完成解開細胞 30 億鹼基對的密碼，對生命科學的層面產生了革命性的影響。

若一基因座具有兩種以上的對偶基因，並且在族群中所佔的比例大於 1%，則稱此基因座具有多型性 (polymorphism)。最簡單的例子是 ABO 血型有 A、B、AB、O 四種對偶基因，各種基因型在族群中各佔部分。利用多樣性的特性讓遺傳學家可以以此為標記，在譜系資料中觀察基因座在染色體中共同分離 (cosegregation) 的現象，尋找致病基因可能的位置。在染色體中除了基因座具有多樣性之外，任何區域只要有此特性皆可作為多型性標記 (polymorphism marker)，常見的有限制酶片段長度多型性、數目可變之串聯重複序列 (variable number tandem repeat, VNTR)、微衛星標記 (short tandem repeat, STR marker、microsatellite)、單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。

單一核苷酸多型性顧名思義是長度僅單一個鹼基的多型性標記，早在 1980 年代 SNP 便已經被發現。當時利用限制片段長度多型性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的技術建立遺傳學連鎖圖譜，實驗進行的過程之中便觀察到有些單一鹼基具有多樣性，造成限制酶切割出與原先不同的模組樣式

(pattern)，這些具有多樣性的鹼基便是 SNP[46]。單一核苷酸多型性是人類染色體眾多基因突變類型中最常見的一種，是指在 DNA 序列上發生一個核酸的改變，且對偶基因頻率(allele frequency)大於 1%。SNP 可發生在任何位置，例如 exon、intron、啟動子(promoter)，但大部分發生在與基因無關的序列。藉由分析 SNP 的分佈情形，可以了解族群的歷史及演化等情形；定義基因與疾病之間的關係，尋找真正與疾病相關之基因。少數 SNP 會改變胺基酸而影響蛋白質功能，雖然對於癌症危險性的影響可能不大，但是多個 SNP 的累積可能會助長癌症之發生或進行。因為癌症是一種病因複雜的疾病，其發生可能是導因於細胞平常逐漸累積基因變異以及內源性或外來性之傷害，經過一段時期甚至是多年之後關鍵性的改變出現，引發正常細胞走向癌化。此外，SNP 也可用來解釋暴露於癌症危險因子下，個人之間感受性有所差異的情形[47]。加上 SNP 易於偵測而且穩定，因此非常適合用來研究癌症與基因之間的關聯性[48]。

### 單一核苷酸多型性之分型

單一核苷酸多型性的分型方法有很多，在各種 SNP 的研究方法中，最早被使用且被應用的最廣泛的就是 RFLP 了。此法操作簡易，成本較低，而且只要實驗設計得當，具有相當高的準確率。

RFLP 是利用限制酵素只會辨識特殊序列的特性，來達到分型的目的。在進



行實驗的時候，首先要挑選適當的酵素，適合的酵素在遇到含有 SNP 的基因片段時，將只會切開其中一種基因型的片段，另一種則保留原貌。藉此便可清楚辨識出不同的基因型。但其操作時間較長，一次所能處理的檢體量較低是其缺點，因此較適合檢體量較低的實驗。

當然，隨著科技的進步，許多專為大量檢測SNP的實驗系統及平台也已陸續被發明。這些平台的共通優點是能同時處理大量實驗檢體，但缺點是通常都非常昂貴，因此較不普遍。以下是幾種常見的基因定型平臺。

#### Beckman GenomeLab SNP stream

一套 Beckman Coulter 公司用以偵測SNPs之基因定型系統，此系統結合標籤-陣列(tagged-array)，多路傳輸 (multiplex) 和單一鹼基引子延伸技術。這個方法提供中量或者巨量的SNP分析。此外，這個系統的優點在Beckman GenomeLab SNPstream基因定型系統上面提供了是一個multiplex之技術，12個SNP能夠同時在一個偵測管(well)中被基因定型分析。

#### ABI Taqman系統

Taqman是以多孔盤為基礎的螢光判定系統，最初為即時聚合酵素連鎖反應 (real time PCR) 表達分析而設計的。在聚合酵素連鎖反應期間Taqman依靠對偶基因特異性與oligonucleotide雜合。沒有分離的前擴增步驟，或者中間的實驗過程，使它成為最簡單的實驗流程。

## Illumina BeadLab基因定型系統

此系統是一種依靠寡核苷酸對SNP位點的等位基因特異性延伸和PCR擴增的方法，其特點是通量大，能同時檢測約1536個SNP位點。該方法的原理是根據SNP兩側已知DNA序列設計上下游探針，檢測每個SNP需要三條寡核苷酸引子：兩條上游探針（assay probes），分別覆蓋同一位點，是等位基因專一性探針（allele-specific probes），分別代表二態SNP中的一種等位基因型；一條下游探針，具有位點特異性（locus-specific probe）。這三條寡核苷酸引子都包括與基因組DNA互補的區域和與通用PCR引子配對的序列。下游探針還包含一段特異性“標誌”序列（address sequence），恰好能與BeadArray中每個小珠上附著的寡核苷酸探針互補結合。由此，這三條寡核苷酸引子組成了一個SNP位點的一套檢測探針；與少量的基因體DNA樣品雜交時，通過延伸、連接和擴增反應獲得帶螢光標記的單鏈，通過特異性“標誌”序列（address sequence），與BeadArray中每個小珠上附著的寡核苷酸探針互補結合。最後經過雷射激發、掃描器採集螢光、資料收集整理和處理分析，最終產生1536個SNP的定型結果。每次每塊晶片能同時檢測96份樣品，即理論上可一次獲得147456（96X1536）個SNP基因定型結果。所以屬於高產能基因定型系統。

## Sequenom MassARRAY系統

此系統利用質譜儀去偵測酵素產物之對偶基因區別反應。Sequenom結合了

單一鹼基延伸或變型的基質輔助雷射脫附游離法飛行時間質譜技術 (MALDI-TOF)，反應後的過程比其他基因定型系統複雜許多，且質譜儀因非常敏感需要純度很高的基因體DNA，Sequenom's Mass-Array系統一天可以分析7500個反應，屬於高產能平台。

#### PerkinElmer AcycloPrime-FP

這套基因定型方法是結合單一核苷酸延伸分析和對偶基因特異性結合螢光標的之去氧核糖核酸(dideoxy-nucleotide triphosphate )(ddNTP)，當偏光螢光增加時可以被偵測到。這系統最大缺點是要經過複雜的PCR及PCR後處理之過程。

#### 單一核苷酸多型性之應用

在過去25年要辨識並找到一個基因在染色體中的位置，最普遍的方法是依靠連鎖分析定位 (linkage mapping)。連鎖分析主要是觀察染色體上的標記與表現型 (phenotype) 之間傳遞 (transmission) 與同分離(cosegregation)等現象，而推斷導致此表現型的對偶基因位在標記附近。1980年代由於分子生物技術的限制，當時只依靠RFLP技術建立了第一套人類基因體的連鎖圖 (linkage map) [49]。隨著聚合酶連鎖反應 (PCR) 的發明，微衛星標記大量被發現利用，微衛星標記是以2至4個核苷酸長度為單位的重複序列，特性是一個標記有多種基因型 (重複次數不同) 而具有「高度多型性」，且在基因體中分布的密度較RFLP標記為高，



大約是3~10 Kb出現一個[50]。因此微衛星標記更加適用於連鎖分析，針對不同實驗組與對照組（例如不同人種、族群或是某一疾病的有無）進行分析時具有很高的靈敏度[51]，使得微衛星標記應用盛極一時，許多單一基因病變都是利用微衛星標記成功定位。然而許多疾病例如糖尿病、心血管疾病、自體免疫疾病以及大多數的癌症並非由單一基因造成，而是屬於多基因遺傳疾病（polygenic disease），每個牽涉其中的基因可能只造成一小部分的影響。除非先收集數百甚至上千的譜系資料，否則靠連鎖分析並不容易偵測到這些基因 [52]。為了解決此一難題，另一套多樣性標記—SNP開始大量應用。SNP標記的特性是分布密度更高，約1000個鹼基出現一次、在基因組中分布均勻，以及非常穩定不易再發生變異，足以建構出一套解析度更高的圖譜，藉由連鎖不平衡定位法（linkage disequilibrium mapping，LD mapping）更精確將基因定位[53]。



## 第二節 研究目的

雖然醫學技術日新月異，但是目前對於癌症這一類的疾病仍然無法完全控制與治癒，尤其有些癌症不容易早期發現，亦無有效之治療方法，導致患者存活率並不高。因此，在更具效果的癌症治療方式尚未被發現之前，如何早期發現癌症，並且提高患者生存率，顯然是現代醫學一大重要課題。

隨著分子生物醫學的進步，目前已發現許多癌症和基因變異有關，若能及早偵測出可能與癌症發生相關的基因變異，就能有機會使人們了解自身的罹癌風險，進而早期發現早期治療。雖然目前已發現許多與口腔癌相關之高外顯率基因 (high penetrance gene)，但僅能解釋部分的口腔癌發生，仍有多數口腔癌之發生無法以已知的基因變異解釋，顯示可能還有其他許多基因與口腔癌的發生有關 [54, 55]。

相對於高外顯率基因，低外顯率基因上的基因多型性雖然對於癌症危險性增加之影響不大，但是在人群中非常常見，對於口腔癌之發生仍可能造成很大的影響，可能更適合用來解釋一般人群中口腔癌之發生。先前也有許多研究顯示口腔癌的發生可能是許多低外顯性基因共同作用之結果，因此，低危險性卻常見的基因變異與高危險性卻少見的基因變異對於口腔癌的發生可能具有相同的重要性 [54, 56]。在本研究中，我們選擇DNA修補系統中的非同源性末端黏合路徑其中的Ku80基因之基因多型性進行病例-對照研究 (case-control study)，我們挑選基因

變異頻率較高，可作為該基因重要性指標之基因多型性進行研究。希望可以藉由探討基因多型性與口腔癌之間的相關性，期望將來能夠應用於臨床上作為預測口腔癌發生之風險的生物指標，以達到早期篩檢的目的。



## 材料與方法

### 研究對象

#### 實驗組 (case)

本論文中600位口腔癌病人之血液檢體來自中國醫藥大學附設醫院耳鼻喉科並取得病人同意，病例之確診由耳鼻喉科之醫師蔡銘修醫師、花俊宏醫師及曾憲彰醫師三位醫師確認，其中包括446位男性與154位女性，平均年齡66.5歲（標準差10.4），其中有吸煙習慣者有452位，嚼檳榔習慣者377位，飲酒習慣者有423位。以腫瘤部位之不同又再細分，病變位於舌部的有296位、病變位於頰黏膜的有170位、病變位於口腔底的有35位、病變位於白齒後三角區的有26位、病變位於齒槽脊的有17位、病變位於上顎的有13位、病變位於嘴唇的有13位而病變位於其他部位則有30位。

#### 對照組 (control)

本論文中 600 位對照組之血液檢體來自前往中國醫藥大學附設醫院進行健康檢查之健康志願者，成為對照組之志願者，皆已由臨床醫師確認並無癌症或相關疾病之病史，在取得志願者之同意之後，再依口腔癌病人之性別及年齡分布，挑選與口腔癌病人接近之志願者進行採樣。其中包括 432 位男性與 168 位女性，

平均年齡 63.3 歲 (標準差 8.6)，其中有吸煙習慣者有 428 位，嚼檳榔習慣者 361 位，飲酒習慣者有 402 位。將對照組志願者之各項特徵與病人組相比較，其年齡之 P 值為 0.73，性別之 P 值為 0.36，具有吸菸習慣者之 P 值為 0.12，具有嚼檳榔習慣者之 P 值為 0.34，具有飲酒習慣者之 P 值為 0.19。(表一)

### 檢體收集與問卷 (Questionnaire)

每位口腔癌患者採集 3-5 毫升(ml)之全血於含有乙二胺四醋酸(EDTA) 抗凝劑之採血管中，並進行有組織性之問卷調查。問卷內容包括患者個人之基本資料，例如年齡、聯絡方式、居住地等，以及個人病史與已知口腔癌危險因子，例如抽煙、嚼檳榔及喝酒之習慣，以及家族成員是否帶有口腔癌或其他種類之癌症等。



### 實驗藥品

一般無機鹽與有機溶劑均為分析級，除非特別標示，皆購自美商Merck公司 (New Jersey, USA) 及Sigma chemical公司 (Missouri, USA)。dATP、dCTP、dGTP、dTTP、限制酶、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 所使用之Taq DNA Polymerase及其它酵素皆購自New England Biolabs公司 (Massachusetts, USA) 及Hoffmann-La-Roche (SR product, U.K)。

## DNA 萃取 (DNA extraction)

抽取志願者血液檢體約3-5 ml左右，放入含有乙二胺四醋酸(EDTA) 抗凝劑的管子，上下搖晃均勻，於1500 rpm 下離心15分鐘，之後會發現全血分成三層，最上面一層是血清，中間一層是包含白血球的buffy coat，最底層則為紅血球。以吸管吸取介於血漿和紅血球之間的buffy coat，置入含有3 ml RBC lysis buffer的管中充分混合均勻，並靜置於碎冰上三十分鐘以充分讓紅血球溶解。將紅血球溶解之後的細胞懸浮液於室溫下以500 rpm離心20分鐘，小心倒掉上層紅色的紅血球溶解液，留下濃縮白血球部份。將0.8ml之GenoMaker reagent (真興公司) 加入濃縮白血球，用振盪器打散試管底部的白血球，並分裝至1.5 ml微量離心管，靜置於室溫下5分鐘，將白血球溶解並釋放出DNA。之後加入chloroform至1.5 ml，混合均勻，於冷凍離心機以12000 rpm 離心10分鐘，吸取上清液至乾淨的1.5 ml 微量離心管，加入和上清液等量的isopropanol (可沉澱DNA)，上下輕輕搖晃使上下兩層液體充分混合，待有白色絲狀物出現，即為DNA，接著以12000 rpm 離心5分鐘。小心倒掉上清液，加入300  $\mu$ l的酒精 (75% alcohol) 以進行鹽類的洗滌及DNA之沉澱作用，待DNA沉澱之後，以12000rpm離心5分鐘分離DNA；重覆此步驟二次。把上清液倒掉，離心5分鐘，用微量吸取器吸去水，使其自然乾燥，附著於管壁上的物質即為DNA pellet。靜置等待DNA到呈透明狀後，視DNA的量加入滅過菌的二次水 (dd water) 100  $\mu$ l (或50  $\mu$ l) 稀釋，將此微量離心管置放



於37°C培養箱溶解30分鐘，讓DNA均勻混合溶解，並以1% agarose gel 加入2 µl DNA 進行電泳確認，最後將DNA分裝後置於-20°C下保存。

### **單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位點之選擇**

單一核苷酸多型性指的是 DNA 序列上發生的單一核苷酸鹼基之間的變異，在人群中，這種變異的發生頻率必須至少大於 1%，否則被認定是點突變。人類遺傳基因中的各種差異，有 90%都可歸因於 SNP 所引起的基因變異。在人類基因組中，每隔 100 至 300 個鹼基就會存在一處 SNP。每 3 個 SNP 中有兩個會是胞嘧啶 (C) 和胸腺嘧啶 (T) 的相互轉變。

首先藉助於NCBI等資料庫，從已知的位點當中，精選出我們感興趣的SNP位點，在本計劃中首先以位於Ku80基因上之位點為重心。我們首先必須尋找出於台灣人族群中適合進行實驗之位點，因為相同的位點在不同之人種身上具有不同之分布情形，有時差異相當巨大。例如，許多位點在西方人身上具有相當平均之分布情形，但是在臺灣人身上卻完全不具有變異性，因此，在進行實驗之前，先挑選出其分布率適合台灣人族群，且與本基因之功能相關之SNP位點以供實驗進行，是相當重要的步驟。

### **單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位點之分型模式**

進行 SNP 研究有許多種方法，其中一種最為人所知的就是 PCR-RFLP，由於此方法之準確率高，操作過程簡易，不易發生難以判讀之結果，且實驗成本較低廉，在現存的許多 SNP 相關研究中，就有許多是以此 PCR-RFLP 方式所進行的，證明此實驗方法雖然較為基礎，但是在正確性以及效率方面，其表現皆是令人滿意的[40-42]。因此本計劃便是以這種方式進行研究，將此方法概述於下。

### 特異性引子的設計

首先針對我們所選擇的位點，選擇適當的特異性引子，用以增幅內含單一核苷酸位點的 DNA 片段，在引子設計時，需注意 DNA 片段的長度須適中，應設計在 200 到 1000 bp 之間，以便於進行實驗。且引子設計好之後，須先進行 PCR，以確定其反應溫度及實驗效果，並觀察其產物大小是否合乎預期。本實驗中針對位於 *ku80* 基因上之三個單一核苷酸多型性位點，設計了以下三組，共六股之特異性引子。

*Ku80* G-1401T rs828907:

5'-TAGCTGACAACCTCACAGAT-3'

5'-ATTCAGAGGTGCTCATAGAG-3'

產物大小：252 bp

*Ku80* C-319T rs11685387:



5'-TCTAACTCCAGAGCTCTGAC-3'

5'-AACTCTGAGCATGCGCAGAT-3'

產物大小：311 bp

*Ku80* intron19 rs9288518:

5'-GGTGTGAAGACCTATCAATC-3'

5'-TTACAGAACAAGCCTTGCAC-3'

產物大小：275 bp

### 限制酵素的選擇

只有具辨識片段涵蓋單一核苷酸位点的限制酵素，才可以用來進行分型的試驗。因此，當特异性引子設計完成後，下一步便是挑選適合的限制酵素，使PCR產物經過酵素的作用後，在電泳時的產物能夠辨別不同的基因型，並確認不同基因型之檢體，經限制酵素切割後之產物大小，方能進行實驗。本實驗中針對位於*ku80*基因上之三個單一核苷酸多型性位點，設計了以下三支限制酵素，詳細資料及產物切割後之大小如下。

*Ku80* G-1401T rs828907

Bfa I

cut from 252 bp G type into 81+171 bp T type

*Ku80* C-319T rs11685387

Spe I

cut from 311 bp C type into 108+203 bp T type

*Ku80* intron19 rs9288518

Bsr I

cut from 275 bp A type into 110+165 bp G type

### 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction) 就是在利用 Taq polymerase 在體外對特定的基因作大量複製和製造，使原本量少的樣本可以因為 PCR 而量變多，大量放大。

由耐高溫的古細菌 (hyperthermophilic archaea) 如 *Thermus aquaticus* 分離出的 Taq DNA polymerase，因為對熱穩定，故可以在高溫條件的 PCR 反應中作用，而不須在每一個循環後再添加一次 DNA polymerase。

利用雙股DNA重複地分開和複製，而達到增幅所需片段的目的是，每一次的循環步驟如下：

(1) Denaturation：將目標DNA加熱至約94°C，打斷鹼基對間的氫鍵，雙

股DNA分開。

(2) Priming :

❶ 加入含有primers、DNA polymerase和足夠dNTP的混合液到目標DNA中，將溫度降至約55°C使primers能夠黏上單股DNA。

❷ Primers的作用是提供3'OH端讓DNA polymerase能合成DNA (DNA polymerase一定要有3'OH端才能合成DNA)

❸ 55°C能讓單股DNA再形成雙股，但因為有過多的primers，使得當溫度降到55°C時，DNA不是和原本的另一股配對形成雙股，而是和primers配對。

(3) Extension : 將溫度升到72°C，使DNA polymerase以DNA為模板，進行聚合反應，合成DNA的速率會增加。

於本研究中，我們以事先已抽取好的 genomic DNA 2.5~10 pmole 體積為 5  $\mu$ l 當做模板，並以 PCR 反應放大 *Ku80* G-1401T rs828907, *Ku80* C-319T rs11685387 及 *Ku80* intron19 rs9288518 位置之基因片段。在總反應體積為 25  $\mu$ l 的反應溶液中加入 0.5  $\mu$ l 的 10 mM dNTP、各 0.5  $\mu$ l 的 5'端和 3'端的兩股引子、滅菌後的二次水 15.5  $\mu$ l、0.5  $\mu$ l 的 Taq polymerase、配合 Taq polymerase 之 10 倍緩衝液 (10 mM Tris-HCL, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu$ l 進行聚合酶鏈鎖反應。

將上述溶液置於 1.5 ml 的 PCR 專用試管充分混合均勻後，放入聚合酶鏈鎖

反應循環儀 (Bio-Rad mycycler) 於 94°C 加熱 5 分鐘後便進入 PCR 反應。PCR 的反應條件為 94°C、30 秒，55°C、30 秒，72°C、30 秒進 35 個循環後再於 72°C 下反應 10 分鐘。反應後的產物再以膠體凝膠電泳加以確認並比較產物大小，以確認該次實驗有確實增幅出我們所想要增幅的片段。

### 凝膠電泳法 (Gel electrophoresis)

核酸電泳主要利用核酸帶負電荷的特性，於電場中會穿過膠體，如：agarose 或 polyacrylamide 膠體，而朝向正極移動。因為不同分子量的核酸，在膠體孔徑中移動的速度會有差異，藉此將不同大小的核酸分開。Agarose 膠體為較普遍用為電泳的材料，主要因為其製備方便及簡單，常使用在 200 bp~50 kb 核酸片段間的分析，且通常以水平式電泳槽來進行電泳。

核酸電泳後，膠體中的核酸可經 ethidium bromide (EtBr) 染色，EtBr 會嵌入核酸鹼基中，以紫外線照射，則核酸吸收紫外線波長的光線，再經 EtBr 放出可見波長的光線，藉以觀察核酸之位置。EtBr 染色之濃度為 0.5 µg/ml。除了在電泳後，再將膠體浸染於 EtBr 溶液外，亦可在製備膠體時，直接將 EtBr 加入膠體內，使核酸在電泳進行中被染色，以節省電泳後，需要染色的時間，但經 EtBr 嵌合的核酸，其電泳速率會降低，如：直線型核酸，約降低 15% 的移動速率。在本實驗中，我們是採用膠體電泳之後再加以染色的方式進行實驗。

我們將混合均勻的PCR反應產物4  $\mu$ l和1  $\mu$ l的loading dye混合均勻，在電泳槽中以0.5X TBE buffer作為電泳的介質，以100伏特進行約30分鐘的電泳，電泳完成後將膠片置於EtBr中染色20分鐘，最後放在UV燈光下觀察結果。在經過確認之後，我們可以清楚發現，PCR的產物大小符合我們的預期，*Ku80* G-1401T rs828907的產物大小為252 bp，*Ku80* C-319T rs11685387的產物大小為311 bp，*Ku80* intron19 rs9288518的產物大小為275 bp。

#### 限制片段長度多型性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

限制片段長度多型性分析實驗進行流程如下：

*Ku80* G-1401T rs828907

取出8  $\mu$ l *Ku80* G-1401T rs828907 PCR產物，以限制酵素0.5  $\mu$ l (10U/ $\mu$ l)的Bfa I (New England Biolabs公司, USA)，與1.5  $\mu$ l的10X緩衝液及5  $\mu$ l的水，使總反應體積為15  $\mu$ l，於37°C下作用overnight。反應後以3% agarose gel於100伏特電壓進行電泳分析RFLP，再以ethidium bromide 染色並在UV燈光下照相存檔判讀結果。*Ku80* G-1401T rs828907之T type經Bfa I處理後會得到81 bp和171 bp兩個片段，而若是G type，則不會被Bfa I切割，所以依舊是252 bp。(圖一)

*Ku80* C-319T rs11685387

取出8  $\mu$ l *Ku80* C-319T rs11685387 PCR產物，以限制酵素0.5  $\mu$ l (10U/ $\mu$ l)的Spe I (New England Biolabs 公司, USA)，與1.5  $\mu$ l的10X緩衝液及5  $\mu$ l的水，使總反應體積為15  $\mu$ l，於37°C下作用overnight。反應後以3% agarose gel於100伏特電壓進行電泳分析RFLP，再以ethidium bromide 染色並在UV燈光下照相存檔判讀結果。*Ku80* C-319T rs11685387之T type經Spe I 處理後會得到108 bp和203 bp兩個片段，而若是C type，則不會被Spe I 切割，所以依舊是311 bp。(圖二)

#### *Ku80* intron19 rs9288518

取出8  $\mu$ l *Ku80* intron19 rs9288518 PCR產物，以限制酵素0.5  $\mu$ l (10U/ $\mu$ l)的Bsr I (New England Biolabs公司, USA)，與1.5  $\mu$ l的10X緩衝液及5  $\mu$ l的水，使總反應體積為15  $\mu$ l，於37°C下作用overnight。反應後以3% agarose gel於100伏特電壓進行電泳分析RFLP，再以ethidium bromide 染色並在UV燈光下照相存檔判讀結果。*Ku80* intron19 rs9288518之G type經Bsr I 處理後會得到110 bp和165 bp兩個片段，而若是A type，則不會被Bsr I 切割，所以依舊是275 bp。(圖三)

#### 統計分析 (Statistical analysis)

問卷結果利用Excel建立檔案並整合實驗結果。本論文所使用之分析方法如下(1)皮爾森卡方分析(Pearson chi-square test)：用以比對2個族群(group)間基因型



之分布是否有差異，當任一期望值小於5時，會以費雪爾正確概率計算(Fisher's exact test)來加以校正。判讀標準為 $p$ 值( $p$  value)小於0.05時( $p < 0.05$ )，則認定其具有統計上的差異。(2)對偶基因頻率 (allele frequency)：帶有基因多型性或變異的單條染色體在族群中出現之比率。



## 結果

### ***Ku80* G-1401T rs828907的RFLP結果分析**

*Ku80* G-1401T rs828907在以特異性引子進行PCR放大所須片段後，經膠體電泳確認產物大小確為252 bp無誤。將600支口腔癌病患之檢體與600位正常對照組之檢體皆以此特異性引子進行PCR反應，經膠體電泳確認，合計1200支檢體皆可放大出所需片段，且其產物大小亦皆正確無誤。再以限制酵素Bfa I處理後，於膠體電泳中可發現產物之大小皆合乎預期。(圖一)

### ***Ku80* C-319T rs11685387的RFLP結果分析**

*Ku80* C-319T rs11685387在以特異性引子進行PCR放大所須片斷後，經膠體電泳確認產物大小確為311 bp無誤。將600支口腔癌病患之檢體與600位正常對照組之檢體皆以此特異性引子進行PCR反應，經膠體電泳確認，合計1200支檢體皆可放大出所需片段，且其產物大小亦皆正確無誤。再以限制酵素Spe I處理後，於膠體電泳中可發現產物之大小皆合乎預期。(圖二)

### ***Ku80* intron19 rs9288518的RFLP結果分析**

*Ku80* intron19 rs9288518在以特異性引子進行PCR放大所須片斷後，經膠體電

泳確認產物大小確為275 bp無誤。將600支口腔癌病患之檢體與600位正常對照組之檢體皆以此特異性引子進行PCR反應，經膠體電泳確認，合計1200支檢體皆可放大出所需片段，且其產物大小亦皆正確無誤。再以限制酵素Bsr I處理後，於膠體電泳中可發現產物之大小皆合乎預期。(圖三)

### ***Ku80* G-1401T rs828907的基因多型性分析**

*Ku80* G-1401T rs828907在病患及正常對照組之基因型分佈、對偶基因之發生率和攜帶率之資料分析見表二及表三。實驗結果600位口腔癌病患中，G/G、G/T、T/T基因型分別有405 (67.5%)、132 (22.0%) 及63 (10.5%) 位，而在600位正常對照組中，G/G、G/T、T/T基因型分別有445 (74.2%)、107 (17.8%) 及48 (8.0%) 位。在600位口腔癌病患中，G、T之對偶基因攜帶率分別為942 (78.5%) 及258 (21.5%)，而在600位正常對照組中，G、T之對偶基因攜帶率分別為997 (83.1%) 及203 (16.9%) 位。以卡方試驗分析，比較口腔癌病患與正常對照組之*Ku80* G-1401T rs828907位點對偶基因頻率其P value為0.038303(<0.05)，具有顯著相關性。而其對偶基因攜帶率與對照組間之P value為0.004373(<0.05)，亦具有高度顯著相關性。此統計結果顯示口腔癌病患及正常對照組無論是在*Ku80* G-1401T rs828907之基因型分佈亦或是在對偶基因的攜帶率皆具有顯著差異。

不論是在*Ku80* G-1401T rs828907之基因型分佈亦或是在對偶基因的攜帶率

上，於有吸菸(表四)或是飲酒習慣(表六)之病患及正常對照組中，皆未觀察到顯著相關性。但於有嚼食檳榔習慣之病患及正常對照組之基因型分佈中，有嚼檳榔習慣之口腔癌病患，其*Ku80* G-1401T rs828907位點之基因型為GG者有254位，基因型為GT或TT者有123位。而有嚼檳榔習慣之正常對照組，其*Ku80* G-1401T rs828907位點之基因型為GG者則有271位，基因型為GT或TT者有90位。其*p* value為0.021097(<0.05)具有統計上之顯著相關性(表五)。無嚼食檳榔習慣之口腔癌病患，其*Ku80* G-1401T rs828907位點之基因型為GG者有151位，基因型為GT或TT者有72位，而無嚼食檳榔習慣之正常對照組，其*Ku80* G-1401T rs828907位點之基因型為GG者有174位，基因型為GT或TT者則有65位。其*p* value為0.231282(>0.05)不具有統計上之顯著相關性。(表五)

#### ***Ku80* C-319T rs11685387的基因多型性分析**

*Ku80* C-319T rs11685387在病患及正常對照組之基因型分佈、對偶基因之發生率和攜帶率之資料分析見表二及表三。實驗結果600位口腔癌病患中，C/C、C/T、T/T基因型分別有86(14.3%)、158(26.3%)及356(59.3%)位，而在600位正常對照組中，C/C、C/T、T/T基因型分別有79(13.2%)、153(25.5%)及368(61.3%)位。在600位口腔癌病患中，C、T之對偶基因攜帶率分別為330(27.5%)及870(72.5%)，而在600位正常對照組中，C、T之對偶基因攜帶率分別為311

(25.9%) 及 889 (74.1%) 位。以卡方試驗分析，比較口腔癌病患與正常對照組之 *Ku80* C-319T rs11685387 位點對偶基因頻率其 *p* value 為 0.749668，無顯著相關性。而其對偶基因攜帶率與對照組間之 *p* value 為 0.380709，亦無顯著相關性。此統計結果顯示口腔癌病患及正常對照組無論是在 *Ku80* C-319T rs11685387 之基因型分佈亦或是在對偶基因攜帶率皆不具有顯著差異。

不論是在 *Ku80* C-319T rs11685387 之基因型分佈亦或是在對偶基因的攜帶率上，於有吸菸、嚼食檳榔或是飲酒習慣之病患及正常對照組中，皆未觀察到顯著相關性。(表二、表三)

#### ***Ku80* intron19 rs9288518 的基因多型性分析**

*Ku80* intron19 rs9288518 在病患及正常對照組之基因型分佈、對偶基因之發生率和攜帶率之資料分析見表二及表三。實驗結果 600 位口腔癌病患中，A/A、A/G、G/G 基因型分別有 72 (12.0%)、216 (36.0%) 及 312 (52.0%) 位，而在 600 位正常對照組中，A/A、A/G、G/G 基因型分別有 66 (11.0%)、205 (34.2%) 及 329 (54.8%) 位。在 600 位口腔癌病患中，A、G 之對偶基因攜帶率分別為 360 (30.0%) 及 840 (70.0%)，而在 600 位正常對照組中，C、T 之對偶基因攜帶率分別為 337 (28.1%) 及 863 (71.9%) 位。以卡方試驗分析，比較口腔癌病患與正常對照組之 *Ku80* intron19 rs9288518 位點對偶基因頻率其 *p* value 為 0.606792，

無顯著相關性。而其對偶基因攜帶率與對照組間之 $p$  value為0.301037，亦無顯著相關性。此統計結果顯示口腔癌病患及正常對照組無論是在*Ku80* intron19 rs9288518之基因型分佈亦或是在對偶基因攜帶率皆不具有顯著差異。

不論是在*Ku80* intron19 rs9288518之基因型分佈亦或是在對偶基因的攜帶率上，於有吸菸、嚼食檳榔或是飲酒習慣之病患及正常對照組中，皆未觀察到顯著相關性。(表二、表三)





## 討 論

### *Ku80* 之單一核苷酸多型性與口腔癌之易感性

在位於基因上或是基因附近的單一核苷酸多型性位點中，位點分佈的位置是相當重要的。一般而言，常被作為研究對象的位點，依其分佈位置的不同，可以將這些單一核苷酸多型性位點分成三種，分別是位於基因的外顯子(exon)、內含子(intron)及啟動子(promoter)。位於外顯子上的單一核苷酸多型性位點，常常被作為研究對象，也最受到研究者的重視，因為基因的外顯子所含的 DNA 將會轉錄(transcript)為 RNA，而 RNA 會再轉譯(translation)為胺基酸(amino acid)，由這些胺基酸組合而成的蛋白質產物，則會在體內進行各項功能。因此，位於外顯子上的單一核苷酸多型性位點，又可以依其是否會造成其胺基酸的改變，再細分為兩種，分別為同義型編碼(coding synonymous)及非同義型編碼(coding nonsynonymous)。

顧名思義，同義型編碼意指此單一核苷酸多型性位點的改變並不會造成胺基酸產物的變化，而非同義型編碼型位點的改變，則會導致胺基酸產物改變。因此，非同義型編碼型位點的重要性不言可喻，在許多單一核苷酸多型性的研究當中常常發現，此型位點的改變雖然只是一個核苷酸的變化，但是在使得下游的一個胺基酸改變之後，整個基因的蛋白質產物的功能，常常會發生相當顯著的影響。關

於這種現象，有許多有名的例子，而且不僅僅可見於人類。例如在人類與家貓身上都可見到一種遺傳性的疾病，叫自體顯性遺傳之多囊腎疾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease)。這個疾病在家貓身上是由一個位於 *PKDI* 基因上第 29 號外顯子上的單一核苷酸多型性位點由 C 變成 A 所引起的，而這個位點，就是屬於非同義型編碼型位點，體內具有這項變異的家貓，發病機率為百分之百，而不具有這項遺傳變異的家貓，則完全不會發生這項疾病[57]。因此，此疾病為探討單一核苷酸多型性與疾病之關連性時的一個極佳範例。

但也是由於此型的單一核苷酸多型性位點對於基因以及人體正常功能的影響常常過於重大。因此，若是此種基因變異發生在一些與維持生命相關的位置上，常常會導致個體在年幼時或是在胚胎期便死亡，所以此型的單一核苷酸多型性位點並不常見。尤其在一些重要的維生系統上的基因，想見到此型基因變異的機會少之又少。

在本次實驗所針對的 *Ku80* 基因便是一例，雖然在前人的研究當中，曾發現七個非同義型編碼型位點，但是在後續進行了更多研究之後，發現這些非同義型編碼型位點其變異之頻率皆太低，因此在研究上的價值並不大。我們推測，這樣的結果或許間接說明了 *Ku80* 基因在維持基因體穩定性以及個體生命上的重要性，因為一旦在此基因上出現了可能嚴重影響其正常功能的變異時，其後果將會相當嚴重，甚至導致死亡，因此我們便無法見到非同義型編碼型位點在 *Ku80* 基

因上出現。

在本實驗中所分析的三個單一核苷酸多型性位點之中，有兩個位點--*Ku80* G-1401T rs828907 及 *Ku80* C-319T rs11685387 是位於 *Ku80* 基因的啟動子 (promoter) 區域，此類單一核苷酸多型性位點亦常被作為單一核苷酸多型性相關研究的主角，在現有的研究當中，已有許多結果指出此類位點常常在多種疾病的發生上，扮演了重要的角色。

此類位點所分佈的位置是位於基因起始點(start codon)之上游 2000 個鹼基之內的區域。也正因如此，一般此類位點在命名時，常常是以位點與起始點之間的鹼基數目作為辨識，且於數字前方會加一“-”號以標示其位於該基因之前方。例如本實驗中之 *Ku80* G-1401T rs828907 及 *Ku80* C-319T rs11685387 兩位點，其位置便是分別座落於 *Ku80* 基因起始點之前的第 1401 及 319 個鹼基的位置。

一般說來，基因的啟動子區域常被認為肩負著調控基因表現的任務。因此啟動子的功能是否健全，往往和基因能否完全發揮正常作用息息相關。與非同義型編碼型位點不同的是，前者倘若發生變異，影響的是一個胺基酸的改變。但是啟動子區域的位點改變，有可能會使得整個基因的表現出現異常，不論是表現量過於低下或是過於強烈。無論何者，皆對於正常的生理機能沒有益處。也是因為這個原因，使得許多進行單一核苷酸多型性研究的研究人員，都對此類位點相當有興趣。

於本實驗中，*Ku80* G-1401T rs828907 的基因型在 600 位口腔癌病患中，G/G、G/T、T/T 基因型分別有 405 (67.5%)、132 (22.0%) 及 63 (10.5%) 位，而在 600 位正常對照組中，G/G、G/T、T/T 基因型分別有 445 (74.2%)、107 (17.8%) 及 48 (8.0%) 位。而以卡方試驗分析，比較口腔癌病患與正常對照組之 *Ku80* G-1401T rs828907 位點對偶基因頻率其 *p* value 為 0.038303 (<0.05)，具有顯著相關性。在這樣的結果中，我們可以發現 G/T 及 T/T 兩種基因型在口腔癌病人組當中所佔的比例，明顯的高出其所在正常對照組中所佔的比例。在 600 位口腔癌病患中，G/T 及 T/T 兩種基因型共有 195 位，共佔了全組的 32.5%。而在 600 位正常對照組中，G/T 及 T/T 兩種基因型共只有 155 位，佔全組的 25.8%。若以對偶基因攜帶率來看，在 600 位口腔癌病患中，G、T 之對偶基因攜帶率分別為 942 (78.5%) 及 258 (21.5%)，而在 600 位正常對照組中，G、T 之對偶基因攜帶率分別為 997 (83.1%) 及 203 (16.9%) 位。因此我們將此位點的 T 型變異型視為口腔癌發生的危險因子，意即體內帶有此型變異型的個體，在罹患口腔癌方面有較高的風險。

見到這樣的結果，我們認為可能是因為此 *Ku80* G-1401T rs828907 位點位於 *Ku80* 基因的啟動子區域上與調控基因表現量較為相關的位置。因此，其變異性很可能會影響到 *Ku80* 基因在 NHEJ 修補系統中的表現量，進而影響到個體 NHEJ 修補路徑的能力與效率，從而增加帶有此種基因變異的個體之口腔癌發生率。

而此 *Ku80* G-1401T rs828907 位點，當其基因型為 G/G 的時候，應為一理想狀態，*Ku80* 基因的表現情形相當正常，因此一旦體內出現 DSB 時，*Ku80* 與其所屬的 NHEJ 路徑將可在短時間內將傷害修復。但是帶有 T 型變異型的個體，可能在修復上就會有困難。但是，從另一個方向來看，相信帶有 T 型變異型，對於 *Ku80* 基因表現的影響並非十分嚴重，而只是輕微的影響其表現而已。畢竟，我們所收集的檢體，皆是由中老年人的身上所取得(口腔癌病患平均年齡 66.5 歲，正常對照組平均年齡 63.3 歲)，倘若此基因變異會嚴重影響 NHEJ 的功能，則帶有基因變異的人，應該在較年幼時，便會出現明顯的病變，甚至是死亡。

進行本實驗的目的之一，便是找出與口腔癌發生具有顯著相關的單一核苷酸多型性位點，以作為篩檢口腔癌高危險群的生物指標。而此基因變異 *Ku80* G-1401T rs828907 位點便是一個相當有潛力的生物指標，但是還需要更多深入的研究，才能使我們更加了解此位點增加口腔癌風險的機制。畢竟在目前的單一核苷酸多型性研究當中，大部分皆只能觀察到顯著相關的現象，而真正造成顯著相關的原因，常常仍屬未知。

*Ku80* C-319T rs11685387 的多型性與口腔癌的發生並無顯著關聯性。但是，這樣的現象，有兩種可能性。一是此單一核苷酸多型性位點的位置，雖然也位於 *Ku80* 基因的啟動子區域上，但其影響力，或是對於基因表現所造成的改變，並不如 *Ku80* G-1401T rs828907 般那麼明顯。另一個可能性，則是或許此單一核苷



酸多型性位點如同 *Ku80* G-1401T rs828907 一樣，會對 *Ku80* 基因造成相當程度的影響，但是在口腔癌的發生上，這樣的現象還不夠明顯，所以我們經過分析之後，無法觀察到顯著的結果。但是很有可能的，或許此單一核苷酸多型性位點，在其他癌症的發生上，會出現高度相關的情形，因此，我們在經過更進一步的實驗之前，不可以輕易推翻此 *Ku80* C-319T rs11685387 位點在癌症發生上的角色。

*Ku80* intron19 rs9288518 位點的多型性與口腔癌的發生並無顯著關聯性。此單一核苷酸多型性位點位於 *Ku80* 基因的第 19 號內含子上，關於位於內含子上的單一核苷酸多型性位點，其所代表的意義，並不如位於其他兩個位置的單一核苷酸多型性位點那麼清楚。但是位於此區的單一核苷酸多型性位點，其變化性是最大的，除了一般常見的兩種變異型的位點之外，還常常出現具有 A、T、C、G 四種變異型的單一核苷酸多型性位點，甚至也有刪去-插入多型性(Deletion-Insertion Polymorphism, DIP)位點的存在。由此可知，位於內含子上的單一核苷酸多型性位點容許較大的變異性，也就是其對於基因以及系統之正常功能的影響性可能較小。不過在先前的許多研究中我們可以發現，有一些位於基因的內含子上的核苷酸多型性位點，與疾病之間具有一定程度的關連性，以我們研究的口腔癌為例，它的發生就已被證實與一個位於血管收縮素轉換酵素(angiotensin I converting enzyme, ACE)基因的內含子上的刪去-插入多型性位點呈現顯著相關 [58]。因此，我們並不可以輕忽位於內含子上的核苷酸多型性位點在口腔癌發生



上所扮演的角色。

我們將口腔癌病人與正常對照組依其是否有抽菸、嚼檳榔與飲酒的習慣再加以細分，並且與 *Ku80* G-1401T rs828907 之基因型分佈進行綜合分析之後，發現在這三種容易引起口腔癌的生活習慣當中，唯有嚼食檳榔的病人，其口腔癌發生率與 *Ku80* G-1401T rs828907 之基因型呈現顯著相關。觀察到這樣的情形，使我們得到一個可能的推論。我們知道，以台灣地區居民嚼食檳榔的習慣，容易使檳榔在口腔中釋放出大量的自由基等容易造成 DNA 雙股斷裂的致癌物，而當這些雙股斷裂的傷害發生時，我們體內的 DNA 修補系統當中的 NHEJ 路徑便會擔負起移除這些傷害的責任。在一些擁有較強 NHEJ 修復能力的人們身上，這些 DNA 損傷演變為口腔癌的機會較小。而在 NHEJ 修復能力較差的人們身上，發生口腔癌的機會就大大增加了。而決定 NHEJ 修復能力強弱的因素又是什麼呢，在本研究中，我們發現一個位於 NHEJ 路徑中的 *Ku80* 基因的啟動子區域之單一核苷酸多型性位點-- *Ku80* G-1401T rs828907，其基因型與口腔癌的發生有顯著的關聯性，而在有嚼食檳榔習慣的人們身上，可發現此關聯性更強。顯示此位點帶有較具風險的基因型之個體，其罹患口腔癌之風險本已較高，但若同時又有嚼食檳榔的習慣，則會在口腔細胞中，製造更多的 DNA 損傷，這對於本已能力較弱的 NHEJ 系統而言，無疑是雪上加霜，因此，這些個體罹患口腔癌的機率比一般人高出許多(圖四)。

本研究針對中台灣地區口腔癌病人進行探討，雖然找出了一個具有顯著關聯性的單一核苷酸多型性位點，但是，其詳細的作用機制與影響途徑，依舊處於未知狀態，還需要更多深入的研究加以探討，才能夠真正的了解詳細的情形。此外，本研究中檢體數目雖然共有 1200 支，但與國際上之先進研究相比，此樣本數量仍稍嫌不足，還需要繼續擴增樣本數，相信可以得到更具意義的結果。最後，本研究乃是目前世界上首度在位於 *Ku80* 基因的單一核苷酸多型性位點上，發現其與口腔癌的易感性具有關聯性，此結果相信可以為投身相關研究的人員，提供一定程度的參考及幫助，也希望可以為台灣地區口腔癌的防治有所助益。



## References

1. Chakravarti, N., M. Mathur, et al. "Expression of RAR alpha and RAR beta in human oral potentially malignant and neoplastic lesions." Int J Cancer **91**(1): 27-31, 2001.
2. Department of Health, Executive Yuan, Republic of China, Cancer registry annual report in Taiwan area 1998, 2002.
3. Paymaster, J. C. "Cancer of the buccal mucosa: Clinical study of 650 cases in Indian patients." Cancer **9**(3): 431-5, 1956.
4. Pillai, R., P. Balaram, et al. "Pathogenesis of oral submucous fibrosis. Relationship to risk factors associated with oral cancer." Cancer **69**(8): 2011-20, 1992.
5. Ye, H., T. Yu, et al. "Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma." BMC Genomics **9**: 69, 2008.
6. Ko, Y. C., Y. L. Huang, et al. "Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan." J Oral Pathol **24**(10): 450-3, 1995.
7. Lo, W. L., S. Y. Kao, et al. "Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival." J Oral Maxillofac Surg

- 61(7):** 751-8, 2003.
8. Pinkel, D., J. Landegent, et al. "Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4." Proc Natl Acad Sci U S A **85(23):** 9138-42,1988.
  9. Gupta, P. C., F. S. Mehta, et al. "Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers." Community Dent Oral Epidemiol **8(6):** 283-333, 1980.
  10. Deichman, G. I., L. M. Kashkina, et al. "Antioxidant defence mechanisms and PGE secretion by different types of transformed and tumor cells: in vivo selective advantages." Adv Exp Med Biol **400(A):** 473-7, 1997.
  11. Lumerman, H., P. Freedman, et al. "Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **79(3):** 321-9, 1995.
  12. Silverman, S. Jr., M. Gorsky, et al. "Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients." Cancer **53(3):** 563-8, 1984.
  13. Chang, K. W., S. C. Lin, et al. "Association of aberrant p53 and p21(WAF1) immunoreactivity with the outcome of oral verrucous leukoplakia in Taiwan." J Oral Pathol Med **29(2):** 56-62, 2000.

14. Sudbo, J., W. Kildal, et al. "DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia." N Engl J Med **344**(17): 1270-8, 2001.
15. Franceschi, S., F. Levi, et al. "Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer." Int J Cancer **83**(1): 1-4, 1999.
16. Hayes, R. B., E. Bravo-Otero, et al. "Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico." Cancer causes Control **10**(1): 27-33, 1999.
17. Schildt, E. B., M. Eriksson, et al. "Oral snuff, smoking habits and alcohol consumption in relation to oral cancer in a Swedish case-control study." Int J Cancer **77**(3): 341-6, 1998.
18. Biolchini, F., G. Pollastri, et al. "Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review." Minerva Stomatol **54**(7-8): 405-14, 2005.
19. Heinzl, P. A., P. Balaram, et al. "Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers." Int J Cancer **68**(4): 420-3, 1996.
20. Thomas, S., J. Brennan, et al. "Mutations in the conserved regions of p53 are infrequent in betel-associated oral cancers from Papua New Guinea." Cancer Res **54**(13): 3588-93, 1994.

21. Murti, P. R., P. C. Gupta, et al. "Effect on the incidence of oral submucous fibrosis of intervention in the areca nut chewing habit." J Oral Pathol Med **19**(2): 99-100, 1990.
22. Valentine, J. A., J. Scott, et al. "A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium." J Oral Pathol **14**(8): 654-65, 1985.
23. Awang, M. N. "Betel quid and oral carcinogenesis." Singapore Med J **29**(6): 589-93, 1988.
24. Boyland, E. "The possible carcinogenic action of alkaloids of tobacco and betel nut." Planta Med: 13-23, 1968.
25. Canniff, J. P. and W. Harvey. "The aetiology of oral submucous fibrosis: the stimulation of collagen synthesis by extracts of areca nut." Int J Oral Surg **10**(Suppl 1): 163-7, 1981.
26. Schlebusch, H. and D. Kern. "Stabilization of collagen by polyphenols." Angiologica **9**(3-6): 248-52, 1972.
27. Rosin, M. P. "The influence of pH on the convertogenic activity of plant phenolics." Mutat Res **135**(2): 109-13, 1984.
28. Nair, U. J., R. A. Floyd, et al. "Formation of reactive oxygen species and of



- 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA in vitro with betel quid ingredients.” Chem Biol Interact **63**(2): 157-69, 1987.
29. Ames, B. N. and M. K. Shigenaga. “Oxidants are major contributor to aging.” Ann N Y Acad Sci **663**: 85-96, 1992.
30. Goode, E. L., C. M. Ulrich, et al. “Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk.” Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(12): 1513-30, 2002.
31. Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. “Mechanisms of human DNA repair: an update.” Toxicology **193**(1-2): 3-34, 2003.
32. Friedberg, E. C. “DNA damage and repair.” Nature **421**(6921): 436-40, 2003.
33. Fleck, O. and O. Nielsen. “DNA repair.” J Cell Sci **117**(Pt 4): 515-7, 2004.
34. Kehrer, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease.” Crit Rev Toxicol **23**(1): 21-48, 1993.
35. Machlin, L. J. and A. Bendich. “Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients.” FASEB J **1**(6): 441-5, 1987.
36. Nair, U. J., G. Obe, et al. “Role of lime in the generation of reactive oxygen species from betel-quid ingredients.” Environ Health Perspect **98**: 203-5, 1992.
37. Khanna, K. K. and S. P. Jackson. “DNA double-strand breaks: signaling, repair

- and the cancer connection.” Nat Genet **27**(3): 247-54, 2001.
38. Lieber, M. R., Y. Ma, et al. “Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining.” Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 712-20, 2003.
39. Venkitaraman, A. R. “Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2.” Cell **108**(2): 171-82, 2002.
40. Chiu, C. F., H. C. Wang, et al. “A new single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with breast cancer susceptibility in Taiwanese patients.” Anticancer Res **28**(1A): 267-70, 2008.
41. Chiu, C. F., M. H. Tsai, et al. “A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with oral cancer susceptibility in Taiwanese patients.” Oral Oncol [Epub ahead of print], 2007.
42. Chiu, C. F., C. H. Wang, et al. “A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with gastric cancer susceptibility in Taiwan.” Ann Surg Oncol **15**(2): 514-8, 2008.
43. Wang, S. Y., L. Peng, et al. “Genetic variants of the XRCC7 gene involved in DNA repair and risk of human bladder cancer.” Int J Urol [Epub ahead of print], 2008.
44. Bau, D. T., H. C. Tseng, et al. “Oral cancer and genetic polymorphism of DNA

- double strand break gene Ku70 in Taiwan.” Oral Oncol [Epub ahead of print], 2008.
45. Xing, J., X. Wu, et al. “Prognostic significance of ataxia-telangiectasia mutated, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, and Ku heterodimeric regulatory complex 86-kD subunit expression in patients with nonsmall cell lung cancer.” Cancer [Epub ahead of print], 2008.
46. Botstein, D., R. L. White, et al. “Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.” Am J Hum Genet **32**(3): 314-31, 1980.
47. Mitrunen, K., P. Sillanpaa, et al. “Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk.” Carcinogenesis **22**(5): 827-9, 2001.
48. Ratnasinghe, D., S. Yao, et al. “Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk.” Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(2): 119-23, 2001.
49. Lander, E. S. and D. Botstein. “Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms.” Proc Natl Acad Sci U S A **83**(19): 7353-7, 1986.
50. Weber, J. L. and C. Wong. “Mutation of human short tandem repeats.” Hum Mol

Genet **2**(8): 1123-8, 1993.

51. Shriver, M. D. and K. D. Allen. “Defining child noncompliance: an examination of temporal parameters.” J Appl Behav Anal **30**(1): 173-6, 1997.
52. Risch, N. and K. Merikangas. “The future of genetic studies of complex human diseases.” Science **273**(5281): 1516-7, 1996.
53. Jorde, L. B. “Linkage disequilibrium as a gene-mapping tool.” Am J Hum Genet **56**(1): 11-4, 1995.
54. Sathyan, K. M., K. R. Nalinakumari, et al. “Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility.” Oral Oncol **42**(6): 607-13, 2006.
55. Nair, U. J., J. Nair, et al. “Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers.” Carcinogenesis **20**(5): 743-8, 1999.
56. Serefoglou, Z., C. Yapijakis, et al. “Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer.” Oral Oncol [Epub ahead of print], 2008.
57. Lyons, L. A., D. S. Biller, et al. “Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1.” J Am Soc Nephrol **15**(10): 2548-55, 2004.

58. Chung, F. M., Y. H. Yang, et al. “Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is associated with risk of oral precancerous lesion in betel quid chewers.” Br J Cancer **93**(5): 602-6, 2005.



表一

口腔癌病人及正常對照組之各項特徵

| Characteristics    | Controls (n = 600) |       |            | Patients (n = 600) |       |             | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|--------------------|--------------------|-------|------------|--------------------|-------|-------------|-----------------------|
|                    | n                  | %     | Mean (SD)  | n                  | %     | Mean (SD)   |                       |
| Age (y)            |                    |       | 63.3 (8.6) |                    |       | 66.5 (10.4) | 0.73                  |
| Gender             |                    |       |            |                    |       |             | 0.36                  |
| Male               | 432                | 72.0% |            | 446                | 74.3% |             |                       |
| Female             | 168                | 28.0% |            | 154                | 25.7% |             |                       |
| Indulgence         |                    |       |            |                    |       |             |                       |
| Cigarette smokers  | 428                | 71.3% |            | 452                | 75.3% |             | 0.12                  |
| Areca chewers      | 361                | 60.2% |            | 377                | 62.8% |             | 0.34                  |
| Alcohol drinkers   | 402                | 67.0% |            | 423                | 70.5% |             | 0.19                  |
| Histology          |                    |       |            |                    |       |             |                       |
| Tongue             |                    |       |            | 296                | 49.3% |             |                       |
| Buccal mucosa      |                    |       |            | 170                | 28.3% |             |                       |
| Mouth floor        |                    |       |            | 35                 | 5.8%  |             |                       |
| Retromolar trigone |                    |       |            | 26                 | 4.3%  |             |                       |
| Alveolar ridge     |                    |       |            | 17                 | 2.8%  |             |                       |
| Palate             |                    |       |            | 13                 | 2.2%  |             |                       |
| Lip                |                    |       |            | 13                 | 2.2%  |             |                       |
| Others             |                    |       |            | 30                 | 5.0%  |             |                       |

<sup>a</sup>*P* based on  $\chi^2$  test.



表二

口腔癌病人及正常對照組之*Ku80*基因單一核苷酸多型性位點基因型

| Genotype           | Controls | %     | Patients | %     | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|--------------------|----------|-------|----------|-------|-----------------------|
| G-1401T rs828907   |          |       |          |       | <b>0.038303</b>       |
| GG                 | 445      | 74.2% | 405      | 67.5% |                       |
| GT                 | 107      | 17.8% | 132      | 22.0% |                       |
| TT                 | 48       | 8.0%  | 63       | 10.5% |                       |
| C-319T rs11685387  |          |       |          |       | 0.749668              |
| CC                 | 79       | 13.2% | 86       | 14.3% |                       |
| CT                 | 153      | 25.5% | 158      | 26.3% |                       |
| TT                 | 368      | 61.3% | 356      | 59.3% |                       |
| Intron19 rs9288518 |          |       |          |       | 0.606792              |
| AA                 | 66       | 11.0% | 72       | 12.0% |                       |
| AG                 | 205      | 34.2% | 216      | 36.0% |                       |
| GG                 | 329      | 54.8% | 312      | 52.0% |                       |

<sup>a</sup>*P* based on  $\chi^2$  test.



表三

口腔癌病人及正常對照組之 *Ku80* 基因單一核苷酸多型性位點對偶基因攜帶率

| Allele             | Controls | %     | Patients | %     | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|--------------------|----------|-------|----------|-------|-----------------------|
| G-1401T rs828907   |          |       |          |       | <b>0.004373</b>       |
| Allele G           | 997      | 83.1% | 942      | 78.5% |                       |
| Allele T           | 203      | 16.9% | 258      | 21.5% |                       |
| C-319T rs11685387  |          |       |          |       | 0.380709              |
| Allele C           | 311      | 25.9% | 330      | 27.5% |                       |
| Allele T           | 889      | 74.1% | 870      | 72.5% |                       |
| Intron19 rs9288518 |          |       |          |       | 0.301037              |
| Allele A           | 337      | 28.1% | 360      | 30.0% |                       |
| Allele G           | 863      | 71.9% | 840      | 70.0% |                       |

<sup>a</sup>*P* based on  $\chi^2$  test.



表四

口腔癌病人及正常對照組中吸煙者之 *Ku80* 基因單一核苷酸多型性位點基因型

| Genotypes        | Cigarette smokers |          | <i>P</i> <sup>a</sup> | non-Cigarette smokers |          | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|------------------|-------------------|----------|-----------------------|-----------------------|----------|-----------------------|
|                  | Controls          | Patients |                       | Controls              | Patients |                       |
| G-1401T rs828907 |                   |          |                       |                       |          |                       |
| GG               | 318               | 310      | 0.060872              | 127                   | 95       | 0.061917              |
| GT+TT            | 110               | 142      |                       | 45                    | 53       |                       |

<sup>a</sup>*P* based on  $\chi^2$  test.



表五

口腔癌病人及正常對照組中嚼檳榔者之 *Ku80* 基因單一核苷酸多型性位點基因型

| Genotypes        | Areca chewers |          | <i>P</i> <sup>a</sup> | Non-areca chewers |          | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|------------------|---------------|----------|-----------------------|-------------------|----------|-----------------------|
|                  | Controls      | Patients |                       | Controls          | Patients |                       |
| G-1401T rs828907 |               |          |                       |                   |          |                       |
| GG               | 271           | 254      | <b>0.021097</b>       | 174               | 151      | 0.231282              |
| GT+TT            | 90            | 123      |                       | 65                | 72       |                       |

<sup>a</sup>*P* based on  $\chi^2$  test.

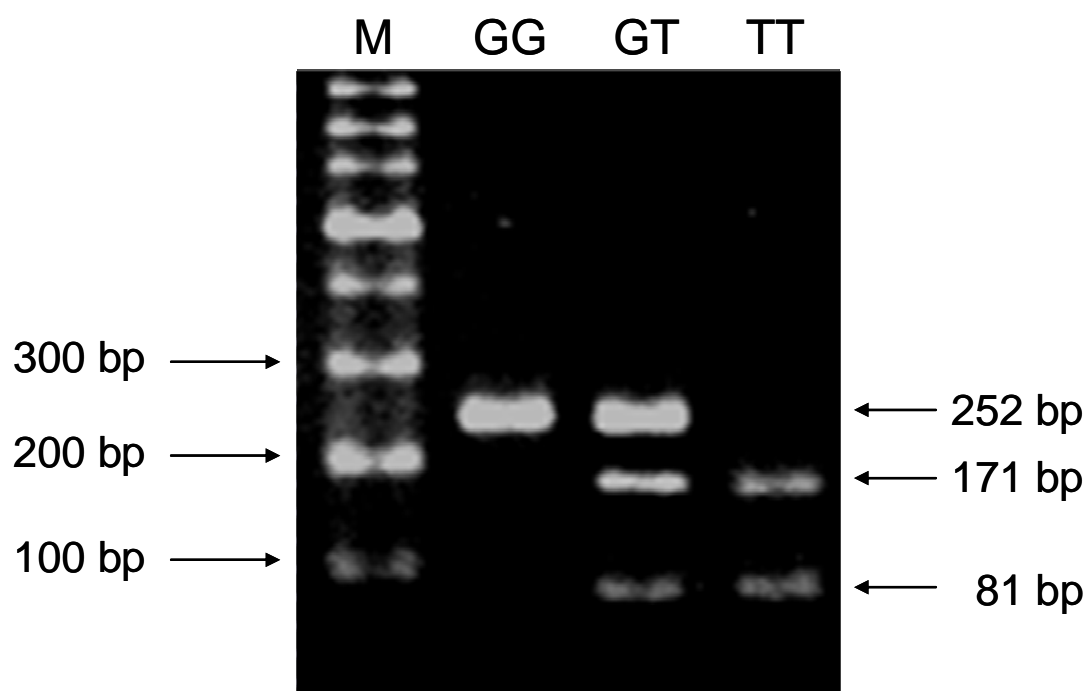


表六

口腔癌病人及正常對照組中飲酒者之 *Ku80* 基因單一核苷酸多型性位點基因型

| Genotypes        | Alcohol drinkers |          | <i>P</i> <sup>a</sup> | non-Alcohol drinkers |          | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|------------------|------------------|----------|-----------------------|----------------------|----------|-----------------------|
|                  | Controls         | Patients |                       | Controls             | Patients |                       |
| G-1401T rs828907 |                  |          |                       |                      |          |                       |
| GG               | 301              | 291      | 0.052453              | 144                  | 114      | 0.082542              |
| GT+TT            | 101              | 132      |                       | 54                   | 63       |                       |

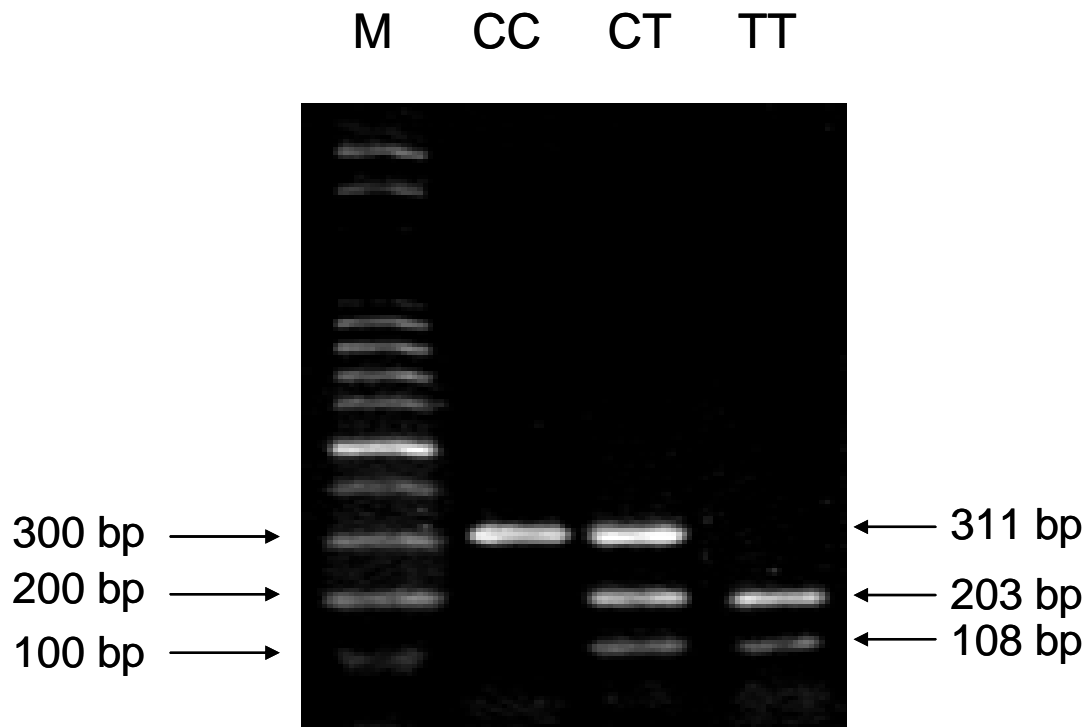




圖一 *Ku80* G-1401T rs828907 基因多型性的凝膠電泳圖。

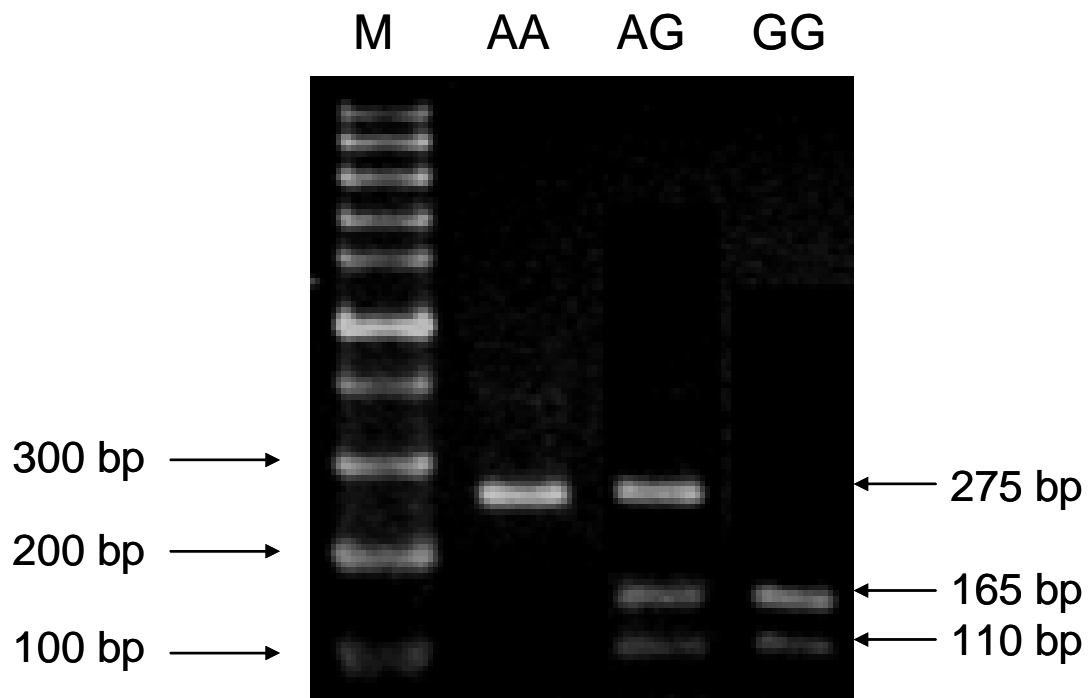
可在基因多型性位置，使用 Bfa I 作用後，無法切斷則為 252 bp 含核酸"G"之對偶基因。若將其切成 171 bp 及 81 bp 者為含核酸"T"之對偶基因。





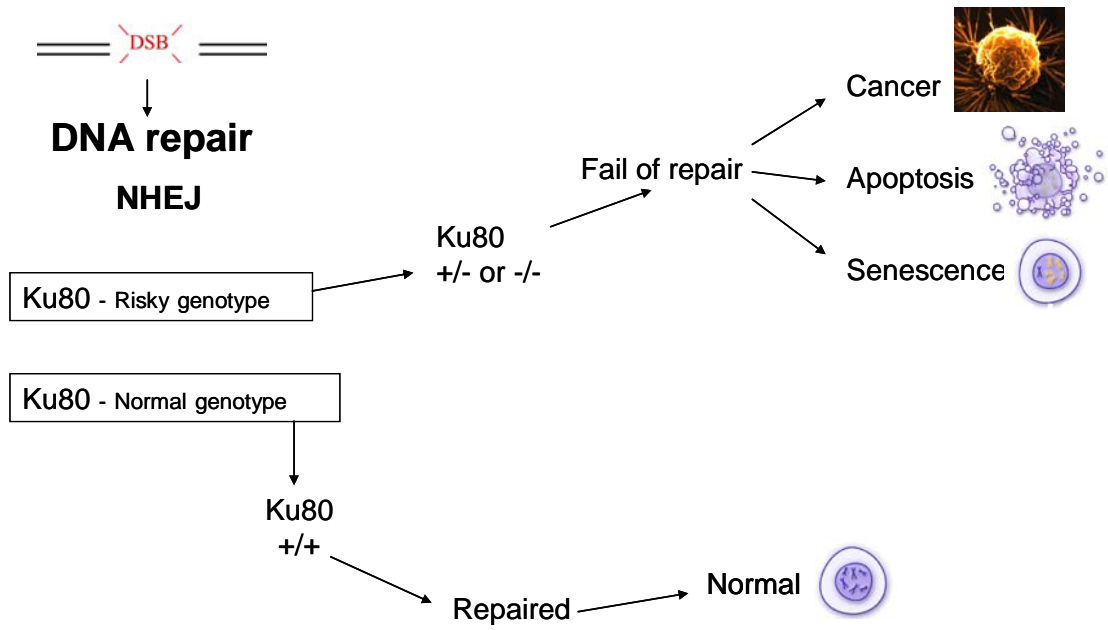
圖二 *Ku80* C-319T rs11685387 基因多型性的凝膠電泳圖。

可在基因多型性位置，使用 Spe I 作用後，無法切斷則為 311 bp 含核酸 "C" 之對偶基因。若將其切成 203 bp 及 108 bp 者為含核酸 "T" 之對偶基因。



圖三 *Ku80* intron19 rs9288518基因多型性的凝膠電泳圖。

可在基因多型性位置，使用Bsr I作用後，無法切斷則為275 bp含核酸"A"之對偶基因。若將其切成165 bp及110 bp者為含核酸 "G"之對偶基因。



圖四 Ku80基因之單一核苷酸多型性位點與口腔癌發生之關係

