

Genetic aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) in tongue carcinomas

Akiyuki Murano, Kanae Ono, Hirofumi Koike, Yosuke Endo, Ken Shimada, Kenshi Kawasaki,
Hitomi Nomura, Masashi Shiiba, Katsuhiro Uzawa, Hideki Tanzawa
Department of Dentistry and Oral Surgery, Chiba University Hospital, Chiba, Japan

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2012;38:121-6)

Aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) are frequently observed in several human cancers. In this study, 20 squamous cell carcinoma (SCC) specimens from the tongue were examined in order to evaluate the role of 8p in SCC of the tongue. Microsatellite analysis using 14 markers demonstrated two commonly deleted regions (CDRs) on 8p. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed frequent down-regulation of the *FEZ1* gene, mapped to 8p22, and frequent over-expression of the cathepsin B gene, mapped to 8p-21-22. These results suggested that genetic aberrations are involved in the development of SCC of the tongue. However, no significant relationship was observed to be established between the genetic alterations and clinicopathological features. Thus, further investigation is necessary in order to clarify the clinical role of 8p in carcinoma of the tongue.

Key words: Loss of heterozygosity, Tongue carcinoma, *FEZ1* gene, *Cathepsin B* gene

I. 제 언

사람의 암은 특정 염색체 영역의 유전자 변화가 증첩된 결과 발생한다¹⁻³. 사람의 제8번 염색체단완(8p)상의 헤테로 접합성 상실(loss of heterozygosity, LOH)은 전립선암⁴, 결장·직장선종⁵, 유방암⁶, 방광암⁷, 두경부암⁸, 구강인두암⁹ 등 다양한 종류의 종양을 대상으로 높은 빈도로 출현하는 것으로 보고되었고, 특히 8p22 영역의 공통 결실 영역이 많은 암종양에 존재하는 것으로 알려져 왔다. 최근 8p22에 신규 암억제 유전자로서 *FEZ1/LZTS1* (leucine zipper 암억제유전자후보. 본 논문에서는 *FEZ1* 유전자)가 분류되어¹⁰, 구강전반의 *FEZ1* 유전자 발현 상황을 보고하였다¹¹. 본 연구에서는 대상을 설편평표피암 증례에 한정시켜, 설암의 8p 염색체상의 이상집적 부위를 검색하기 위한 LOH 분석을 실시하였고, 아울러 그 이상집적 부위 주변에 존재하는 2개의 암 관련 유전자(*FEZ1* 유전자와 *cathepsin B* 유전자)의 발현

상태를 조사함으로써 제8번 염색체단완(8p)과 설편평표피암과의 관련을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 조직 샘플

2000년부터 2004년까지 치바 대학 병원의 외과 절제 시, 설암환자 20증례를 대상으로 원발성 종양 조직과 이에 대응하는 정상 조직(혀의 정상 상피)을 채취하였다. 환자 전 원과 그 가족으로부터 사전동의 및 치바대학 생명윤리위원회의 승인을 받았다. 채취한 조직은 2개의 부분으로 나누었다. 1개는 곧바로 동결하여 DNA 또는 RNA를 추출할 때까지 -80°C로 보존하였고, 다른 한편은 병리 조직진단을 위해 10% 포르말린으로 고정하였다. 병리 조직학적 분류는 치바 대학 의학부 병리학교실에서 국제 종양분류¹²에 준하여 실시하였다. 임상 병리의 병기는 TNM 분류에 의해 결정하였다¹³.

2. 핵산의 조제

게놈 DNA는 페놀·클로로포름법으로 동결 표본에서 추출하여, 에탄올로 정제하였다¹⁴. 토탈 RNA는 SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA)으로

Akiyuki Murano

Department of Oral Surgery, Funabashi Municipal Hospital 1-21-1, Kanasugi,
Funabashi, Chiba 273-8588, Japan
TEL: +81-47-438-3321 FAX: +81-47-438-7323
E-mail: murano-cib@umin.ac.jp

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

동결 조직에서 추출하였다. DNA 농도와 RNA 농도는 분광광도계에 의해 추정하였다. 표본은 사용 시까지 -80°C로 보존하였다.

3. 마이크로 새틀라이트 DNA 분석

이번 실험에서는 8p에 있는 14의 마커(D8S264, D8S262, D8S277, D8S254, D8S265, LPL, D8S285, D8S298, D8S133, D8S87, D8S136, D8S255, D8S261, D8S538)를 선택하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 증폭은 이전의 논문을 따랐다^{11,15}. 각 PCR 반응액은 DNA 표본 50 ng, 각각의 프라이머 20 pmol, Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3.0 mM, dNTP 2 mM와 Taq DNA 폴리메라제(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 0.5 유닛을 포함해 최종량 20 μL로 하였다. PCR은 DNA 서멀 사이클러(Perkin-Elmer)에 의해 94°C로 1분 변성, 52-58°C로 1분 어닐링, 72°C로 1분 신장을 1 사이클로 하여 합계 26-30 사이클 실시하였다. 반응 후, PCR 산물은 적절한 양의 포름아미드와 색소의 혼합액(95% 포름아미드, 20 μM EDTA, 0.05% 브로모페놀 블루, 0.05% Xylene cyanol)으로 희석하였다. PCR 산물을 열변성시켜(95°C, 10분) 열음 위에서 냉각한 후 요소 7 M을 함유한 변성 폴리아크릴 아마이드 겔 5%로 전기 영동(50 W로 2-3.5시간)을 실시하였다. 그 후, 오토라디오그래프를 실시하였다. 즉 전기영동 후, 겔을 80°C로 진공 건조하여, 실온에서 12-48시간 X선 필름에 노광시켰다. 헤테로접합성 상실(LOH) 또는 마이크로 새틀라이트 불안정성(mirosatellite instability, MSI)을 나타내는 각 샘플에 대해, 결과의 재현성을 확실하게 하기 위해 2번째의 PCR-마이크로 새틀라이트 분석을 실시해 확인하였다.

4. LOH 및 MSI의 평가

각 레인의 DNA 양에 대한 차이를 보정한 후, 종양 DNA의 신호 강도와 대응하는 정상적인 DNA의 신호 강도를 비교하였다. 50% 이상의 신호 강도 저하를 LOH로 정의하여, 종양의 밴드 패턴이 정상적인 밴드 패턴과 다른 경우를 MSI 양성으로 평가하였다¹⁵. 전기 영동에서 대립유전자가 분리하지 않고 LOH를 확인할 수 없는 증례는 해석 불능(not informative case, NI)으로 하였다. 임상지표와 LOH 빈도와의 관련은 피셔 검정으로 $P < 0.05$ 의 경우에 유의차가 있는 것으로 하였다.

5. FEZ1 유전자와 cathepsin B 유전자의 mRNA 발현 레벨의 반정량적 reverse transcription-PCR 해석

cDNA는 Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 의

해 표본 1.5 μg으로부터 합성하였다. 이 cDNA의 10%를 템플릿으로서 반정량적 reverse transcription (RT)-PCR을 실시하였다¹⁶. FEZ1 유전자 cDNA 증폭용의 프라이머는 (5'-TCCAGGCAGCAACATGATGAG-3')과 (5'-GCTCCTTCGTAGGCCAGGCTGGA-3')를 이용하였다¹⁰. PCR은 94°C로 5분 후, 94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 30초의 증폭을 합계 28사이클 실시하였다. 아울러 cathepsin B 유전자의 PCR을 실시하였다. 프라이머는 (5'-ACTCCATCCCTCCCTGTGA-3')과 (5'-CCGTAGTGCTTGTCCTGTTGTAG-3')를 이용하였다. 프라이머의 설계는 Primer3 program (Howard Hughes Medical Institute, Bethesda, MD, USA)으로 실시하였다. PCR은 94°C로 5분 후, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 증폭을 합계 30사이클 실시하였다. PCR 산물의 확인은 TA클로닝 시스템(Invitrogen, CH Groningen, the Netherlands)을 이용하였고, PCR 벡터에 클론화하여 Cy5 thermo Sequenase Dye Terminator Kit (Amersham-Pharmacia Biotech)를 사용한 dideoxy method에 의해 시퀀스하여 확정하였다. 유전자발현의 상대 레벨을 정량화하기 위해, 전기 영동한 PCR 산물을 자외선·사진 촬영하였다. 획득한 밴드는 화상 해석 소프트웨어(National Institutes of Health image, Bethesda, MD, USA)로 정량화한 후, 내부 마커로서 이용한 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)밴드의 정량치에 대한 비율로서 계산하였다. 정상 조직과 암조직에 대한 mRNA 발현량의 비교는 Mann-Whitney의 U검정으로 실시하여, $P < 0.05$ 의 경우에 유의차가 있는 것으로 하였고, 해석은 2회 반복 실시하였다.

III. 결 과

1. 설편평표피암의 염색체 8p 결실지도

마이크로 새틀라이트 분석의 전기 영동 패턴의 대표적인 예를 Fig. 1. A에 제시하였다. 또한, 각각의 마이크로 새틀라이트 마커에 대한 informative, LOH, MSI 각각의 케이스 빈도는 Table 1에 정리하였다. 사용한 14개의 마커 중 70% 이상의 informative 증례는 10개 있었으며, 이에 대해 LOH의 빈도를 조사하였다. D8S258 및 D8S87 영역에서 높은 빈도로 LOH가 인정되어 그 비율은 각각 54.5% 및 50.0%이었다. MSI는 D8S264에서 20.0%, LPL에서 21.4%의 빈도로 인정되었다. 각각의 증례와 마커에 대한 마이크로 새틀라이트 분석의 결과를 기초로, Fig. 2에 8p의 결실지도를 작성하였다. 이러한 결과를 통해 고빈도로 LOH가 인정된 D8S258 및 D8S87 영역은 8p22의 공통 결실영역(commonly deleted region, CDR)으로 생각되었다. 또한, 8p22에 존재하는 암억제 유전자 FEZ1의 반정량적 RT-PCR법의 전기 영동 결과의 대표적인 예를 Fig. 1. B에 제시하였

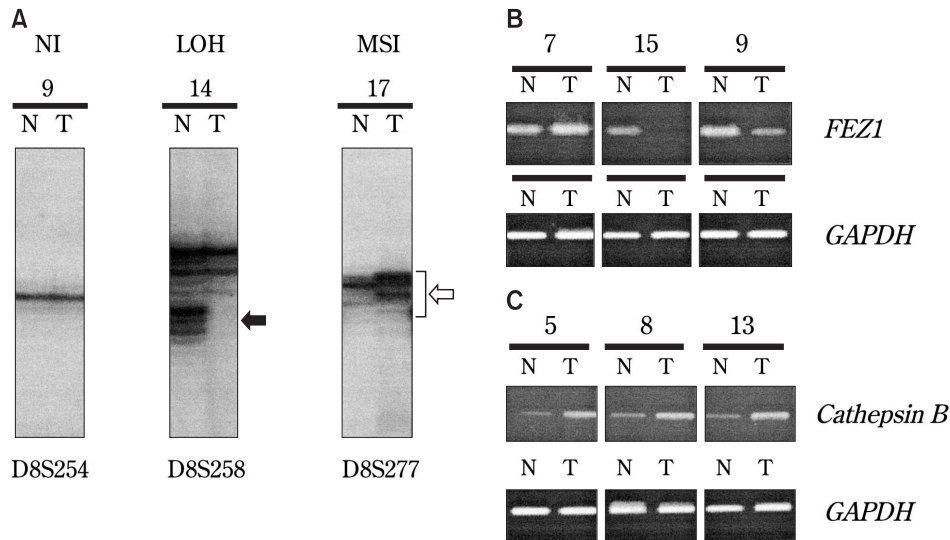


Fig. 1. Change of genes on chromosome 8 (8p) and gene expression of *FEZ1* and *cathepsin B*. A. Typical examples of microsatellite analysis are shown. The number, N, T, and the bottom symbol indicate a case number, normal tissue, tumor tissue, and a microsatellite marker, respectively. The left picture shows a typical example where no allelic segregation occurred, not analyzable (not informative, NI). The middle picture shows a representative example where loss of heterozygosity was observed (loss of heterozygosity, LOH), and the solid arrow indicates loss of one allele. The right picture shows a typical example indicating gene instability (microsatellite instability, MSI). B. Expression analysis of *FEZ1* gene (reverse transcription-polymerase chain reaction [RT-PCR]). (*GAPDH*: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). The expression level of the *FEZ1* gene showed no change in case 7, disappeared in case 15, and decreased in case 9. C. Expression analysis of *cathepsin B* gene (RT-PCR). The expression level was enhanced in every case.

Akiyuki Murano et al: Genetic aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) in tongue carcinomas. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2012

Table 1. Fourteen markers used in microsatellite analysis and analytical results

マイクロサテライト マーカー	染色体上の位置	Informative cases (%)	LOH: % (LOH/Informative cases)	MSI: % (MSI/Informative cases)
D8S264	8p23.2-8pter	15 (75.0)	13.3 (2/15)	20.0 (3/15)
D8S262	8p23.1-8p23.2	14 (70.0)	0.0 (0/14)	14.3 (2/14)
D8S277	8p23.1	14 (70.0)	21.4 (3/14)	14.3 (2/14)
D8S254	8p22	16 (80.0)	31.3 (5/16)	0.0 (0/16)
D8S265	8p22	8 (40.0)	25.0 (2/ 8)	0.0 (0/ 8)
D8S261	8p22	10 (50.0)	0.0 (0/10)	10.0 (1/10)
LPL	8p22	14 (70.0)	35.7 (5/14)	21.4 (3/14)
D8S258	8p22	11 (55.1)	54.5 (6/11)	9.1 (1/11)
D8S298	8p22	16 (80.0)	18.8 (3/16)	6.3 (1/16)
D8S133	8p21.3	10 (50.0)	30.0 (3/10)	10.0 (1/10)
D8S87	8p12	14 (70.0)	50.0 (7/14)	0.0 (0/14)
D8S136	8p11.2	14 (70.0)	21.4 (3/14)	7.1 (1/14)
D8S255	8p11.2	15 (75.0)	13.3 (2/15)	13.3 (2/15)
D8S538	8p11.2	15 (75.0)	6.7 (1/15)	13.3 (2/15)

LOH; loss of heterozygosity; ヘテロ接合性の消失

MSI; microsatellite instability; 遺伝子不安定性

Akiyuki Murano et al: Genetic aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) in tongue carcinomas. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2012

다. *FEZ1* 유전자가 설암조직 검체에서 정상조직과 비교하여 5분의 1 이하로 발현감약한 증례는 전 20 증례 중의 8 증례(40.0%)였다. 또한, 양자의 발현량에는 유의차가 인정되었다.(Fig. 3) 8p21-22에 존재하는 *cathepsin B* 유전자의 반정량적 RT-PCR법의 전기 영동 결과에서는 *cathepsin B* 유

전자가 정상 조직과 비교해 설암조직 검체에서 5배 이상 발현 증강한 증례는 전 20증례 중의 13증례(65.0%)였다.(Fig. 1. C) 또한, *cathepsin B* 유전자의 발현은 암조직 검체에서 유의로 증가하고 있었다.(Fig. 3)

이상의 8p상의 유전자적 이상(2개소의 CDR에 대한 LOH

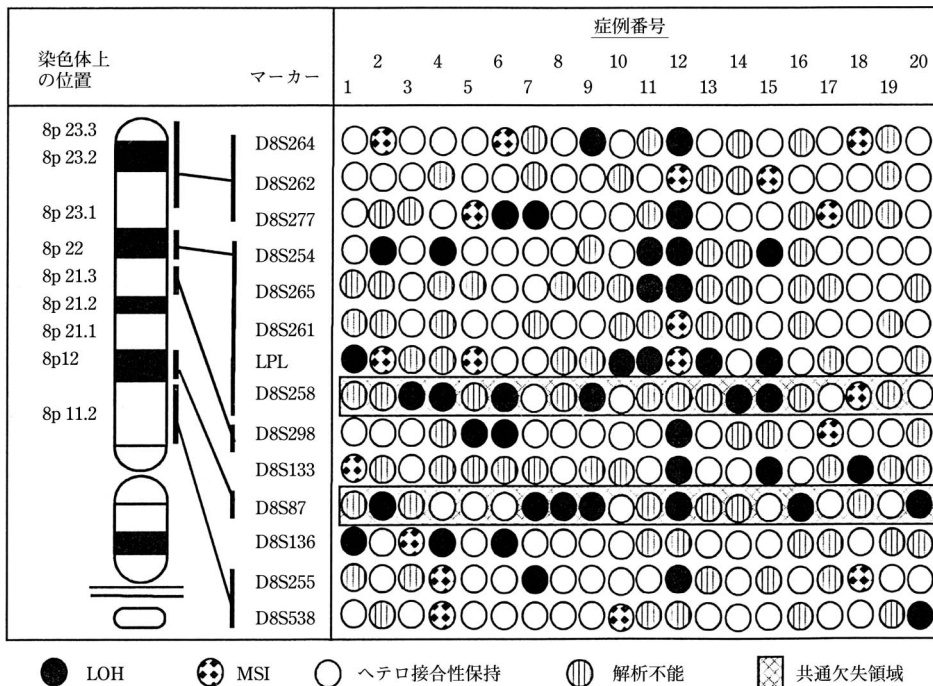


Fig. 2. Deletion map of chromosome 8p. A deletion map is shown, based on genetic abnormalities in the 8p region obtained by microsatellite analysis. A high frequency of loss of heterozygosity was observed in D8S258 and D8S87 regions of the microsatellite marker (54.5% and 50.0%, respectively); each was regarded as a common deletion region.

Akiyuki Murano et al: Genetic aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) in tongue carcinomas. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2012

의 유무와 *FEZ1* 유전자의 발현감약/소실 및 *cathepsin B* 유전자의 발현 증강)과 임상상의 지표와의 관련에 대해 해석하였다.(Table 2) 수술 시 연령, 성별, T분류, N분류, 스테이지 분류, 조직 분화도를 검토 항목으로 조사하였는데, 이번 조사에서 인정된 8p상의 유전자 이상은 어느 임상 지표에 대해서도 통계학적으로 유의한 관련성을 갖지 않았다.

IV. 고 찰

구강암의 염색체나 유전자 이상에 대한 다양한 검색이 활발히 실행되고 있다¹⁷⁻¹⁹. 그중, 구강암의 8번 염색체에 관한 보고는 그리 많지 않으며²⁰, 구강암에 있어서의 역할이나 중요성은 거의 해명되어 있지 않다. 그러한 연유로 이전 우리는 구강암 전반에 관해 염색체 이상과 유전자 이상의 검색을 실시하여 보고하였다¹⁵. 그러나, 유전자 이상 상황과 임상지표의 사이에 유의한 관련은 얻을 수 없었다. 본 연구에서는 대상을 설암으로 한정시키고 8p영역에 존재하는 기타 유전자를 추가하여 구강암에 있어서의 8p염색체 이상의 역할과 의의를 검토하였다.

사람 염색체 8p영역의 LOH와 호모 접합결실은 여러 종류의 종양에서 검출되는 유전자변화이다. 본 실험으로 설암에서 높은 빈도로 LOH가 인정된 2개의 CDR 부위(D8S258, D8S87)의 아렐결실이 위암²¹, 간장 담관암²², 유방암⁶과 전립선암⁴ 등에서 자주 검출되고 있다. D8S258 영역은 염색체상의 8p21-22에 존재하며, D8S87 영역은 8p12에 존재한다. 이 때문에 이러한 영역 주변의 암관련 유전자의 상황을 조사하였다.

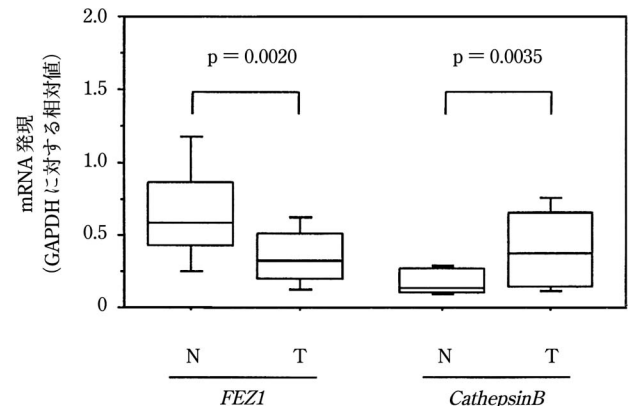


Fig. 3. Comparison of mRNA expression level between *FEZ1* and *cathepsin B* genes. mRNA expression levels of *FEZ1* and *cathepsin B* genes in tumor tissue (T) were compared with those in normal tissue (N). The expression level of the *FEZ1* gene significantly decreased in tumor tissue, whereas that of the *cathepsin B* gene was significantly enhanced.

Akiyuki Murano et al: Genetic aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) in tongue carcinomas. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2012

최근 포지셔널클로닝법으로 8p22에 국재하는 유전자가 분리되어 식도암, 유방암, 전립선암과 관계되는 것으로 밝혀졌다¹⁰. HUGO 유전자용어 위원회는 이 유전자를 *FEZ1* 유전자로 규정하였다. 본 실험을 통해 *FEZ1* 유전자는 설암 평균피암 20종레 중 8종레(40%)로 발현감약, 혹은 소실하고 있었다. 임상지표와의 상관성은 인정받지 못했다.(Table 2)

또한 8p21-22에 존재하는 유전자로서 *cathepsin B* 유전자의 발현 해석을 실시하였다. *cathepsin B* 유전자는 파파인 패밀리의 리소좀·시스테인·단백질 분해효소(lysosomal

Table 2. Relationship between clinical indicators and abnormalities on the short arm of chromosome 8 in patients with squamous cancer of the tongue

臨床諸指標	症例数	FEZ1		Cathepsin B		D8S258		D8S87		
		発現減弱数 (%)	p	発現増強数 (%)	p	LOH 頻度 (%)	p	LOH 頻度 (%)	p	
手術時年齢 (歳)										
< 60	10	4 (40)		7 (70)		2/5 (40)		3/6 (50)		
60 ~ 70	4	2 (50)	NS **	3 (75)	NS	1/2 (50)	NS	2/3 (67)	NS	
> 71	6	2 (33)		3 (50)		3/4 (75)		2/5 (40)		
性別										
男	14	6 (43)	NS	9 (64)	NS	4/8 (50)	NS	5/9 (56)	NS	
女	6	2 (33)		4 (67)		2/3 (67)		2/5 (40)		
T分類										
T1	2	1 (50)		1 (50)		0/1 (0)		1/2 (50)		
T2	5	2 (40)	NS	3 (60)	NS	2/3 (23)	NS	1/3 (33)	NS	
T3	7	2 (29)		5 (71)		3/5 (60)		2/5 (40)		
T4	6	3 (50)		4 (67)		1/2 (23)		3/4 (75)		
N分類										
N (-)	11	5 (45)	NS	7 (64)	NS	4/7 (57)	NS	4/8 (50)	NS	
N (+)	9	3 (33)		6 (67)		2/4 (50)		3/6 (50)		
ステージ分類										
I	2	1 (50)		1 (50)		0/1 (0)		1/2 (50)		
II	4	1 (25)	NS	3 (60)	NS	1/2 (50)	NS	1/3 (33)	NS	
III	4	2 (50)		2 (50)		2/4 (50)		1/3 (33)		
IV	10	4 (40)		7 (70)		3/4 (75)		4/6 (67)		
組織分化度										
高分化型	14	5 (36)		9 (64)		4/8 (50)		5/10 (50)		
中等度分化型	4	2 (50)	NS	3 (75)	NS	1/2 (50)	NS	2/ 3 (67)	NS	
低分化型	2	1 (50)		1 (50)		1/1 (100)		0/ 1 (0)		

* LOH (+) 症例数 /informative 症例数

** NS; not significant

Akiyuki Murano et al: Genetic aberrations on the short arm of chromosome 8 (8p) in tongue carcinomas. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2012

cysteine protease of the papain family)에 속하며, 세포중의 단백질 분해가 주된 기능이지만, 면역 반응에 있어서는 항원 생성, 호르몬 활성화, 뼈대사 등에 관여한다. 또한 질병과의 관련성을 살펴보면 호흡기 계통이나 관절의 만성 염증, 궤양, 암에 관여하고 있다²³. 특히 암에는 그 발현 증강이 몇 가지 종류의 암에서 밝혀지고 있다²⁴. 그러나 구강암에서의 그 역할은 아직도 분명하지 않다. 본 연구에서는 설암 20중례 중 13중례(65%)에서 *cathepsin B* 유전자의 발현 증강이 인정되었고, 설암에서도 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각되어 임상지표와의 관련성을 검색했지만, 안타깝게도 이번 연구에서는 분명한 상관관계를 찾아낼 수 없었다.

본 연구의 결과는 제8번 염색체단완상의 유전자 집적은 설평표피암에 관여하고 있음을 밝혀내었지만, 임상지표에서의 유의차는 인정받지 못했다는 점에서 임상적인 의의에 대해서는 새로운 검색이 필요할 것으로 생각된다.

References

1. Nowell PC, Croce CM. Chromosomes, genes, and cancer. Am J Pathol 1986;125:7-15.
2. Nowell PC. Foundations in cancer research. Chromosomes and cancer: the evolution of an idea. Adv Cancer Res 1993;62:1-17.
3. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:10914-21.
4. Suzuki H, Emi M, Komiya A, Fujiwara Y, Yatani R, Nakamura Y, et al. Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. Genes Chromosomes Cancer 1995;13:168-74.
5. Cunningham C, Dunlop MG, Bird CC, Wyllie AH. Deletion analysis of chromosome 8p in sporadic colorectal adenomas. Br J Cancer 1994;70:18-20.
6. Kerangueven F, Essioux L, Dib A, Noguchi T, Allione F, Geneix J, et al. Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative third susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. Oncogene 1995;10:1023-6.
7. Knowles MA, Shaw ME, Proctor AJ. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms.

- Oncogene 1993;8:1357-64.
8. el-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2656-9.
 9. Wu CL, Roz L, Sloan P, Read AP, Holland S, Porter S, et al. Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:347-53.
 10. Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, et al. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3928-33.
 11. Ono K, Uzawa K, Nakatsuru M, Shiiba M, Mochida Y, Tada A, et al. Down-regulation of FEZ1/LZTS1 gene with frequent loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2003;23:297-302.
 12. Wahi PN. Histological typing of oral and oropharyngeal tumors. In: World Health Organization, eds. *International histological classification of tumours*. vol. 4. Geneva: World Health Organization; 1971.
 13. Sobin LH, Hermanek P, Hutter RV. TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions. *Cancer* 1988;61:2310-4.
 14. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor; 1982:280-1.
 15. Ono K, Miyakawa A, Fukuda M, Shiiba M, Uzawa K, Watanabe T, et al. Allelic loss on the short arm of chromosome 8 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 1999;6:785-9.
 16. Takechi T, Okabe H, Fujioka A, Murakami Y, Fukushima M. Relationship between protein levels and gene expression of dihydropyrimidine dehydrogenase in human tumor cells during growth in culture and in nude mice. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:1144-53.
 17. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256-63.
 18. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;36:311-27.
 19. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol* 2000;36:404-13.
 20. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, Phillips E, Langdon J. Location of candidate tumour suppressor gene loci at chromosomes 3p, 8p and 9p for oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 1999;83:318-25.
 21. Vecchione A, Ishii H, Shiao YH, Trapasso F, Rugge M, Tamburrino JF, et al. Fez1/lzts1 alterations in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1546-52.
 22. Kawaki J, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Yoshidome H, et al. Allelic loss in human intrahepatic cholangiocarcinoma: correlation between chromosome 8p22 and tumor progression. *Int J Cancer* 2000;88:228-31.
 23. Mort JS, Buttler DJ. Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:715-20.
 24. Podgorski I, Sloane BF. Cathepsin B and its role (s) in cancer progression. In: *Proteases and the regulation of biological processes*. Proceedings of the Biochemical Society Symposium. vol. 70. London: Portland Press; 2003:263-76.