

中國醫藥學院

碩士論文

編號：IEH-1108

乳癌與易感性多型性基因的相關性

**Associations of susceptible genetic
polymorphisms
and breast cancer risk**

所 別：環境醫學研究所

指導教授：吳芳鸞

學 生：李怡伽

學 號：8865008

中華民國九十年七月

致謝

研究所兩年一路走來，無論是在學業或做人處世上，均從師長及同窗身上受益良多。感謝吳芳鸞老師兩年來對我的指導與砥勵，在老師百忙之中時還佔用不少時間修改論文，深感抱歉。

並且感謝郭憲文所長、中國醫藥學院附設醫院外科部陳達人醫師與石岡鄉公所在採樣方面的鼎力協助，吳宏達老師統計上的教導，陳昭鈴老師在英文摘要的修改，郭錦堂導師的鼓勵與所內老師們的授業。更感謝職安系賴俊雄主任及中央研究院生醫所沈志陽教授在論文審查時給予的寶貴意見，讓這份論文能更加充實完整，誠屬感激。

感謝自我進環醫所就對我照顧有加的寶文學姊在實驗及生活的幫助，以及保萱學長在課業方面的眷顧。毓珊、昇哥、美娟等學長姊對我的關懷，同窗的慶慧、阿福、玉琪、大毛、秀芬、佩玉、彎彎、小婉、賴姊、阿良等人平時的鼓勵，彥文、經緯、鎧光、伯昌、經綸等學弟妹的打氣，怡菁、小瑞、詩涵、駱馬在我低潮時給予的溫暖，以及在我慌亂不知所措時慷慨伸出援手的許多人，在此一併致謝，感激之情，筆墨實不足以形容。

最後感謝我的雙親及兄長在我快樂或悲傷時包容我，最後這份論文能夠完成，家人是我最大的動力。懷抱著對這所有人及一切的感激，僅將這份論文獻給我摯愛的人們。

怡伽

中國環醫所，七月

摘要

乳癌在婦女癌症方面一直居高不下，最近二十年發生率更有上升二到三倍的趨勢，一般認為與飲食習慣逐漸西化，停經期延遲、環境污染等有關。本研究是要探討易感性多型性基因 (CYP1A1、GSTM1、GSTT1、NAT2) 與乳癌的相關性，並進而探討外來環境因子和個體遺傳基因之交互作用，以 DNA-protein crosslinks (DPC) 做為生物指標。

研究對象為自 1999 年 11 月到 2001 年 1 月自中國醫藥學院附設醫院提供收集的 60 名乳癌病例，每位病例由該院外科醫師詳細診斷，經乳房組織切片檢定確認，並證實罹患乳癌。然後依病例之年齡、性別、抽煙、家族病史配對選取 60 名健康對照組。每名研究對象抽取 6ml 全血，其中 3ml 置於 EDTA 試管中作為抽取 DNA 用，另外 3ml 置於 Heparin 試管中作為分析 DPC 用。以 PCR-RFLP 分析法檢測基因型。並使用結構式問卷，其內容包含有初經、停經、哺乳史、身體質量指數等基本資料。

由結果顯示乳癌患者的平均年齡為 46.7 歲，對照組為 47.3 歲，兩者無統計上顯著差異 ($p=0.75$)，初經年齡在 13 歲以下者的相對危險性為 13 歲以上的 2.1 倍，未曾哺乳的相對危險性為哺乳的 3.5 倍，使用口服避孕藥的相對危險性為無使用者的 4.5 倍 ($p<0.05$)，均具統計上的顯著差異 ($p<0.05$)。另外在教育程度、身體質量指數、第一胎足月生產年齡、足月生產數與使用荷爾蒙補充療法等作分析比較，發現兩組間均無統計上的顯著意義。乳癌病患 / 健康對照組各

個基因的基因型分佈如下： CYP1A1 Msp I 變異型同質合子的百分比為 16.7% / 18.3% , NAT2 慢型為 25.0% / 21.7% , GSTM1 無效型為 56.7% / 38.3% , GSTT1 無效型為 45.0% / 43.3%。以對數迴歸 (logistic regression) 檢定分析均未達統計上顯著差異。在排除家族病史及抽煙等干擾因子後，乳癌病人的 DPC 值為 1.6% , 對照組 DPC 值為 1.0% , 具有統計上的顯著差異($P<0.001$)。

結論為初經年齡較晚、有哺乳及沒有服用口服避孕藥對婦女具有保護作用。過去研究顯示 CYP1A1、 NAT2、 GSTM1 與 GSTT1 四種代謝多型性基因與癌症傾向有關，但本研究並未發現乳癌患者與健康對照組間具有差異性。DPC 是 DNA 損傷的一種生物指標，由資料顯示乳癌患者明顯高於健康對照組。

關鍵字：CYP1A1, NAT2, GSTs, DNA-protein crosslinks (DPC)

Abstract

The incidence of breast cancer has increased approximately two folds in Taiwan over the past 2 decades. This report aimed at exploring the relationship between susceptible genetic polymorphisms (P4501A1 (CYP1A1) and glutathioine S-transferase classes mu and theta (GSTM1 and GSTT1)) and breast cancer. Furthermore, we used DNA-protein crosslinks (DPC) as a biomarker to reflect the quantity of DNA damages.

We recruited 60 breast cancer patients form the department of surgery, China Medical College Hospital ,1999/11 and 2001/1, and the 60 controls,who were age, sex, smoking status, family history matched controls. Our study examined polymorphisms in CYP1A1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 in relation to breast cancer risk in by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). The DPC values of each group were also measured. A structured questionnaire was used to collect relevant information regarding risk factors of breast cancer.

The age of the 60 breast cancer patients was 46.7 years, and controls were 47.3 years, no significant difference being found between the two groups ($p=0.75$). The DPC values of breast cancer patients were 1.6 %, and controls were 1.0 %, a significant difference being found between the two groups ($p<0.001$). Genotypic polymorphisms analysis of CYP1A1, NAT2, GSTM1 and GSTT1,either in combination or separately, in combination shows no significant difference between breast cancer patients and controls,The DPC values of breast cancer patients was greater then that in controls. Our study doesn't identify the association between genotypic polymorphisms and DPC values.

Key words : CYP1A1, NAT2, GSTs, DNA-protein crosslinks (DPC)

目錄

中文摘要	(I)
英文摘要	(III)
第一章、前言	(1)
第二章、文獻探討	(3)
一、 乳癌	(3)
二、 化學致癌物代謝基因型與基因多型性	(5)
三、 DPC	(8)
第三章、材料與方法	(9)
一、 研究對象	(9)
二、 研究方法	(9)
三、 統計方法	(17)
四、 使用藥劑	(18)
五、 試驗材料	(20)
六、 使用儀器	(21)
第四章、結果	(22)
第五章、討論	(26)
第六章、結論	(31)
第七章、參考文獻	(32)
圖表	(41)
附錄	(52)

圖表目錄

表 1 各基因型之引子(primer)序列	(11)
表一、研究對象基本資料分佈	(41)
表二、乳癌患者組與健康對照組 NAT2 基因型分佈	(42)
表三、易感性多型性基因之分佈與比較	(43)
表四、危險因子與基因型迴歸分析	(44)
表五 DPC 與乳癌患者的相關性	(45)
表六、DPC 與乳癌分期的相關性	(46)
表七、乳癌患者基因型與 DPC 的比較	(47)
表八、DPC 之多變項迴歸分析	(48)
圖一、DPC 在乳癌患者與健康對照組的分佈	(49)
圖二、停經前後 DPC 在兩組間之分佈	(50)
圖三、乳癌分期與對照組 DPC 的分佈	(51)

第一章、前言

最近 20 年來台灣婦女乳癌發生率持續上升，依流行病學調查發現由於環境因素的改變，例如飲食習慣逐漸西化，攝取過多的高熱量，高脂肪的食物，且環境污染日益惡化，再加上吸煙人口持續上升，乳癌的盛行率一直增加且年齡呈現年輕化的現象⁽¹⁾。最近衛生署公佈民國 89 年十大死亡原因中惡性腫瘤佔第一位，全台灣平均每 4 位死亡人口中就有一位死於癌症，總人數為 31,554 人，平均每天 86 人死於癌症。在所有癌症死亡原因當中女性乳癌是排名第五名，共有 1,149 人。乳癌死亡率在民國 53 年約為十萬分之 2.24，68 年為 4.22，75 年為 5.0，80 年為 6.71，89 年為 10.6，從民國 53 年到目前看來乳癌死亡人數有逐漸增加的趨勢⁽²⁾。

乳癌受到個人、環境與遺傳因素的影響，根據過去發表的台灣婦女乳癌研究中，通常以病例對照研究來探討乳癌的相關危險因子，這些危險因子包含有教育程度、經濟狀況、初經及停經年齡、生育年齡及胎數、哺乳史、身體質量指數、使用賀爾蒙補充療法與口服避孕藥等⁽¹⁾。由資料顯示自 30 歲以後各年齡層之未婚者乳癌死亡率為已婚者的兩倍，有生育者比沒有生育者可降低乳癌危險性，在教育程度及經濟狀況方面，受 16 年以上教育者比受 16 年以下者其乳癌的危險性較高，且發現收入越高者更呈正相關⁽³⁾。初經年齡較晚，生育胎數越多，初次懷孕年齡低於 30 歲，有哺乳，正常體重者會降低罹患乳癌的風險⁽⁴⁻⁷⁾。

環境污染物亦是乳癌危險因子之一⁽⁸⁻¹⁰⁾，環境污染物包含多環芳香族碳氫化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons ; PAHs)、芳香胺 (aromatic amine)、殺蟲劑、吸煙等。PAHs 等化合物進入人體後會先沈積於肺部，最後會進入血液中再到其他的組織器官。PAHs 是親脂性物質，會貯存在脂肪組織中，包含乳房脂肪組織等^(11,12)。

人體內含有許多易感性代謝酵素，例如細胞色素 P450 (cytochrome P450) 之異構酵素 (isoenzyme) CYP1A1、穀胺基硫轉移酶 (glutathione S-transferase , GST)、N-乙醯基轉移酶 (N-acetyltransferases ; NAT) 等與代謝環境毒素及致癌物有關。CYP1A1 可代謝 PAHs 等化合物成為嗜電性中間產物，較高的酵素活性可能增加 PAHs 的代謝。在 GSTM1 及 GSTT1 的多型性中，有些人沒有 GST 酵素，不能代謝 PAHs 等化合物的中間產物而增加罹患肺癌及乳癌的機率⁽¹³⁾。而 NAT2 的多型性可分為快型與慢型，此酵素在芳香胺致癌上有很強的相關性。乙醯化作用緩慢的人有較高的膀胱癌發生率⁽¹⁴⁾，若有抽煙習慣，則會增加罹患乳癌的風險⁽¹⁵⁾。

過去在 *in vivo* 的研究發現暴露於環境污染物或接受化學治療劑均會誘發 DPC 形成⁽¹⁶⁾，且 DPC 與 DNA 股斷裂⁽¹⁷⁾、姊妹染色分體交換 (SCE)⁽¹⁸⁾、細胞轉形 (transformation)⁽¹⁹⁾、細胞毒性的增加及細胞增殖的改變有關⁽²⁰⁾。因此，為了測量乳癌患者的細胞毒性效應，本研究使用 DNA-protein crosslinks (DPC) 作為生物指標。本研究的目的是要探討乳癌與易感性多型性基因 (CYP1A1、GSTM1、GSTT1 及 NAT2) 間的相關性，及以 DPC 值檢測乳癌患者的 DNA 損傷程度。

第二章、文獻探討

一、乳癌

根據統計，每年全世界有 25 萬人死於乳癌，國內乳癌的發生率逐年上升，為女性癌症發生率的第二位。其發生率民國六十八年為每十萬人口 6.2 人，至八十四年上升為每十萬人口 24.4 人。依據今年行政院衛生署公佈的資料，民國 89 年惡性腫瘤死亡率 25.4%，仍佔十大死因的第一位⁽²⁾。但只要早期發現、早期治療，存活率其實很高。乳癌在西歐與北美為女性最多之癌症⁽⁵⁾，台灣乳癌發生率雖然較低，但包括台灣在內的亞洲女性罹患乳癌的年齡都較歐美年輕 10 至 15 歲。乳癌的發生原因仍不確定，且亞洲婦女早發性乳癌的因素也還不清楚⁽⁶⁾。

乳癌的發生原因複雜，沒有單一因素可完全解釋乳癌的發生，女性乳癌在 25 歲之前較少見，25 歲之後則任何年齡皆可發生。以流行病學研究，在發生率的歸納結果，跟乳癌有關的風險因子有^(2,4,21,22)：

1. 地區：根據美國研究指出地區性的生活習俗或飲食習慣與發生乳癌的相關性大於種族因素。如在美國加州的黑人，罹患乳癌的機會是南非與奈及利亞黑人的三倍風險。
2. 年齡：1976 年聯合國世界衛生組織的報告指出，在乳癌發生率高的國家，乳癌罹患率隨年齡增加而上升，乳癌發生率低的國家，乳癌發生率的年齡高峰為 45 到 65 歲之間，之後隨年齡增加遞減，25 歲以下婦女罹病較少。
3. 家族史：母系一等親如有罹患乳癌則為高危險群。

4. 初經：初經年齡愈早，乳癌發生率越高。
5. 停經：停經較晚的婦女罹患乳癌機率較高。
6. 肥胖：研究顯示身體質量指數大於 25 的停經後婦女風險較高。
7. 足月生產年齡：罹患乳癌風險隨足月生產年齡增加上升。且在 30 歲之前生育的婦女罹患乳癌的機率比未婚或未生產的婦女低。30 歲之後生育的婦女得病機率則高於未婚或未生產的婦女。
8. 哺乳史：有哺乳的婦女罹病的機率較低。
9. 生產胎次、避孕藥、荷爾蒙補充療法的使用：未產婦比多產婦危險性高，避孕藥與荷爾蒙則仍未定論，但某些資料顯示以較高劑量荷爾蒙治療停經症狀的危險性較高。
10. 環境荷爾蒙或 PAHs 等。

流行病學研究顯示個人、環境與遺傳為乳癌的重要影響因子^(21,23,24)，有研究指出 BRCA1 與 BRCA2 基因至少占了乳癌病例的 5%^(23,24)，而台灣婦女的 BRCA1 與 BRCA2 基因缺失與腫瘤有關^(1,3,25)。乳癌是一多重因素（含外因性與內生性致癌物）共同作用的結果。個體對環境暴露的感受性具有差異，個體的差異可能是由於多型性代謝酵素對環境致癌物之活化、去毒或 DNA 損傷之修護能力有所不同所產生。

二、化學致癌物代謝基因與其基因多型性

環境毒物可經不同途徑進入人體，當許多外因性或內生性的化學物質或代謝產物對 DNA 傷害逐漸累積時，便會使細胞逐步癌化，導致癌症生成，故代謝與解毒能力為體內第一道防線^(21,26,27)。由環境毒物導致的致病風險會因不同的酵素代謝速率有所差異⁽²⁸⁻³⁰⁾。增加致癌物活性的第一期酵素 (phase I enzyme) 活性較低，或可代謝毒性物質的第二期酵素 (phase II enzyme) 沒有缺損時，應可保護細胞不受致癌物毒性影響。相對的，如果第二期酵素 (phase II enzyme) 有突變或缺損時，會對環境或內生性因子產生不同感受性，導致致癌風險上升^(21,26)。故致癌物解毒酵素與 DNA 修復酵素在癌症或乳癌中占重要角色。乳癌為多重因子共同作用的結果，但僅有一部分易感性個體暴露於致癌物質會罹患癌症，因此對環境毒物不同活化、去毒，或 DNA 損傷之修復能力的個體差異或許和罹患癌症風險有關⁽²⁷⁾。

許多環境毒物與致癌物質在進入體內經由第一期酵素 (phase I enzyme) 代謝活化，使其和 DNA 反應的能力增加，成為潛在致癌因子，最主要的活化酵素為 cytochrome P450 (CYP)，在十五種 CYP450 酵素中，八種 CYP (CYP1A1、1A2、2A6、2C9、2D6、2E1 與 3A4) 多型性基因被用於研究環境毒物與致癌風險的相關性⁽³¹⁻³⁴⁾。

CYP1A1 位於 15q⁽²³⁾，和芳香烴羥基酶 (aromatic hydrocarbon hydroxylase ; AHH) 酵素活性有關⁽²⁹⁾，可代謝 PAHs 產生嗜電性中間產物如 benzo(a)pyrene 與 7,12-dimethylbenz(a)anthracen 會與 DNA 鍵結，產生突變，導致腫瘤^(28,29)。已有動物實驗證實若懷第一胎之

前暴露於此中間產物會導致癌症。在體外實驗，PAHs 會使乳房上皮細胞轉形，但跟人類乳癌的相關性仍未定，流行病學研究亦顯示抽煙和罹患乳癌風險的相關性並不一致⁽²⁹⁾。

CYP1A1 有兩個主要基因多型性：CYP1A1 Msp I 基因型為 Thymidine 取代 cytosine，在 3'-noncoding region 產生 Msp I 酵素切位⁽³⁵⁾；以及 CYP1A1 Val 基因型，位於 exon7 上，codon462 位置原本的胺基酸 isoleucine 被 valine 取代^(36,37)。Taioi 等人 (1995)⁽³⁸⁾ 對非洲黑人婦女的研究指出罹患乳癌風險和 CYP1A1 Msp I 基因型有關。Zhang 等人 (1996)⁽³⁹⁾ 研究則顯示 CYP1A1 Val 基因型酵素活性和 CYP1A1 Ile 基因型無顯著差異。資料表示 CYP1A1 Val 基因型與 CYP1A1 Msp I 變異型會導致較多中間致癌物生成，使致癌風險上升⁽⁴⁰⁾。

GST 基因群為第二期酵素 (phase II enzyme)，可代謝第一期酵素如 CYP450 所活化的過氧化物，催化 glutathione 共價鍵結過氧化物及 PAHs 等嗜電性化合物，保護細胞 DNA 不受損害^(26,30,41,42)。GSTs 有六個基因位，分為 alpha, mu, pi, sigma, theta, zeta^(21,26,30)。GSTM1 (μ) 位於第 1 號染色體 (1p13.1)，分為無效型與非無效型兩種。GSTM1 無效型為整段基因缺失，依種族不同其分佈由 30% 到 80%^(22,43,44)，白人有 40 到 60% 為此型^(42,45,46)。流行病學研究顯示 GSTM1 無效型在乳癌、結直腸癌、肺癌、胃癌有較高風險^(3,13,21,22,42)。GSTM1 基因產物主要代謝過氧化物、benzo(a)pyrene 及 PAHs 等^(21,22)。另有研究顯示 GSTT1 及 GSTM1 和癌症有關，特別是在肺癌及結直腸癌^(21,30)。GSTT1 及 GSTM1 多型性基因產物會影響酵素活性並可能影響致癌風險^(14,22)。過去的研究顯示 GSTM1 無效型在停經後婦女罹患乳癌的風

險為增加 2.1 倍，白種人 58 歲以下之停經後婦女罹患乳癌風險增加 2.4 倍、罹患皮膚癌與結直腸癌的風險亦會上升^(21,22)。

GSTT1 () 基因位於第 11 號染色體 (11q), 如同 GSTM1 分為無效型與非無效型。GSTT1 無效型亦為整段基因缺失，其比率自 10% 到 65%^(13,44)，白種人無效型比為 10% 至 20%⁽¹⁴⁾，GSTT1 基因產物可代謝多種潛在致癌物質如氯甲烷(methyl chloride) 烷基鹵化物(alkyl halides) 及環氧乙烷 (ethylene oxide) 等⁽⁴⁷⁾，GSTT1 無效型在結直腸癌風險較高^(22,24)，有研究指出 GSTT1 無效型合併 GSTM1 無效型和肺癌有高度相關⁽⁴⁸⁾。

除了 glutathione 共價鍵結，N-acetyltransferases (NAT) 亦為體內毒性物質的重要代謝途徑⁽²⁸⁾。NAT2 位於第 8 號染色體 (8p)⁽⁴⁹⁾，有 M1、M2、M3 三種基因多型性⁽⁵⁰⁾。NAT 可代謝 arylamines 與雜環胺 (heterocyclic amines)⁽⁵¹⁾，對 arylamines 行乙醯化作用(N-acetylation) 代謝解毒^(14,15)，亦進行氧基乙醯化 (O-acetylation)，產生嗜電性中間產物攻擊 DNA。PAHs 及芳基芳香胺已在動物實驗證實會跟乳房上皮細胞 DNA 鍵結，造成腫瘤。NAT2 可區分為快型與慢型^(49,52)。慢型為兩個對偶基因為一個或兩個具有變異，快型為只有一個對偶基因變異或屬於野生型，慢型和膀胱癌有關，快型和結直腸癌有關⁽¹⁴⁾。NAT2 慢型於白人約佔 50%，於黑人比例則稍低⁽¹⁵⁾。Ambrosone 等人(1996)⁽⁵⁰⁾發現帶有 NAT2 慢型的停經後婦女若有 2 至 20 年的抽煙習慣，與罹患乳癌風險呈現劑量效應關係。

三、DPC

多種致癌物質可誘發 DPC 形成⁽¹⁷⁾。DPC 為 DNA 與蛋白質共價鍵結，產生不易被物理方法分離的穩定結構，在正常細胞內 DNA 與蛋白質共價鍵結的百分比不高，但 DPC 會因暴露於甲醛、紫外線、離子或非離子射線或金屬化合物如砷、鉻、鎳等顯著增加^(17,53,54)，這些傷害雖不致造成細胞死亡，但會造成 DNA 損傷或造成 DNA 複製時產生變異，使致癌風險上升^(17,54)。許多研究指出甲醛對哺乳類動物細胞會造成基因毒性及致突變性。動物實驗顯示高濃度甲醛可導致老鼠鼻上皮細胞產生不可逆的損害，亦會造成某些老鼠產生腫瘤。故較高 DPC 值可能會影響健康效應。高 DPC 可能會造成基因表現的改變，也可能造成 DNA 股斷裂，導致染色體異常（CA）與姊妹染色分體交換（SCE）⁽⁵⁴⁾。當損害由某些特定物質所引起，如鉻，細胞修復較慢，如由甲醛引起則修復較快⁽¹⁷⁾。在老鼠與猴子的動物實驗中顯示老鼠的 DPC 含量和組織中甲醛濃度成正比。在體外實驗暴露於環境污染物如重金屬等或香煙中所含甲醛及乙醛或其代謝物質等均會造成 DPC⁽¹⁹⁾。在工業地區工作的工人亦可偵測到淋巴球中有較高 DPC 值，DPC 可偵測體內 DNA 損傷程度，故可被作為生物指標^(54,55)。

第三章、材料與方法

一、研究對象

本研究屬於病例對照研究，病例組為自 1999 年 11 月到 2001 年 1 月，自中國醫藥學院附設醫院收集 60 名乳癌病例。每位病例由該院外科醫師詳細診斷，經乳房組織切片檢定確認。並依病例之年齡、性別、抽煙、家族史配對選取 60 名中部地區婦女為健康對照組。

使用結構式問卷獲得個人相關基本資料，內容包含家族史、初經年齡及停經年齡、經產狀況、哺乳史、口服避孕藥及荷爾蒙的使用、抽煙、喝酒、身體質量指數等。

二、研究方法

每名研究對象抽取 6ml 全血，其中 3ml 置於 EDTA 試管中作為抽取 DNA 及分析基因型用，另外 3ml 置於 Heparin 試管中作為分析 DPC 用。DPC 值測定均於採樣三天內完成細胞計數。

(1) DNA 萃取

將含 EDTA 之試管內的末稍血液離心 1,300rpm 10 分鐘，取出白血球 0.5ml。加入 1.5ml 1X RBC lysis buffer，置於冰上 15 分鐘。離心 2,000rpm 10min，去除上清液後，加入 1 ml GenoMaker reagent。在室溫下靜置 5 分鐘。之後加入 0.5ml chloroform，離心 12,000rpm，4℃，5 分鐘。取出上清液放入新的 1.5ml 微量離心管內，加入 0.5ml isopropanol，在 4℃ 下以 6,000rpm，離心 2 分鐘，移除上清液，加入 1ml 70% ethanol，以 6,000rpm，離心 2 分鐘，除去上清液，此步驟再重複一次。再移除上清液，DNA 溶於 100ul TE buffer。置於 -20℃ 冰存。

(2) 基因型檢定

以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 及限制片段長度多型性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) (PCR-RFLP) 分析 GSTM1、GSTT1、CYP1A1 與 NAT2 四種基因型。四種基因型所用的引子序列顯示於表 1。

表1 各基因型之引子(primer)序列

基因型	引子序列
CYP1A1 (1) ⁽⁵⁶⁾	5'- TCACTCGTCTAAATACTCACCCCTG -3' 5'- TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT -3'
CYP1A1 (2) ⁽⁵⁶⁾	5'- CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT -3' 5'- GAGGCAGGTGGATCACTTGAGCTC -3'
GSTM1 ⁽²⁷⁾	5'- CTGCCCTACTTGATTGATGGG -3' 5'- CTGGATTGTAGCAGATCATGC -3'
GSTT1 ⁽²⁷⁾	5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC -3' 5'- TCTCCGGATCATGGCCAGCA -3'
-globin ⁽²⁷⁾	5'- ACACAACTGTGTTCACTAGC -3' 5'- CAACTTCATCCACGTTCCACC -3'
NAT2 ⁽⁵⁰⁾	5'- TCTAGCATGAATCACTCTGC -3' 5'- GGAACAAATTGGACTTGG -3'

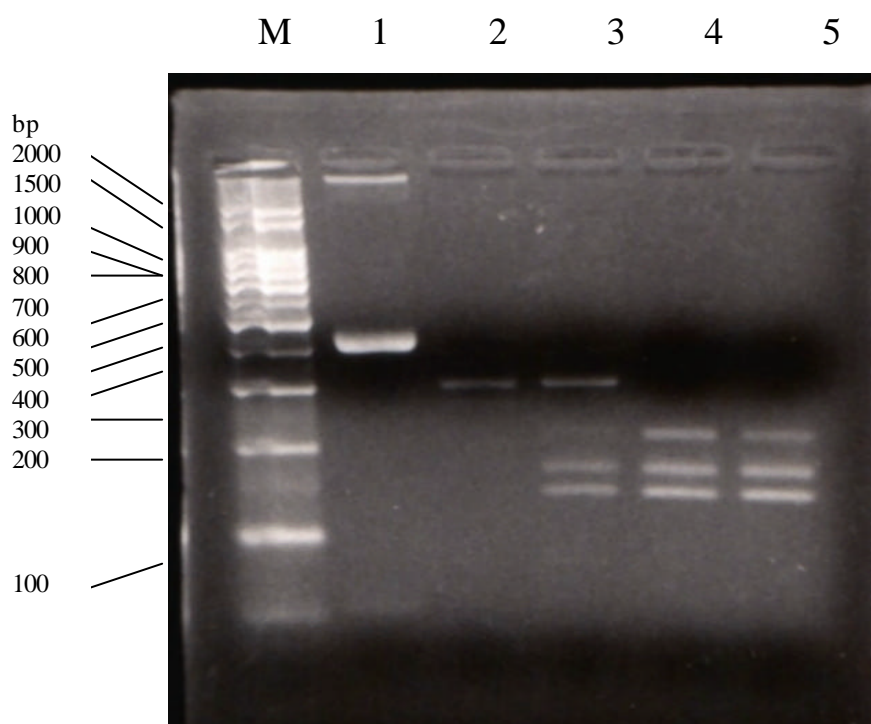
CYP1A1 使用 nested-PCR 法, CYP1A1 (1) 為第一次 PCR 所使用之引子序列, CYP1A1 (2) 為第二次 PCR 所使用之引子序列, NAT2 則使用三種酵素判別基因型。 -globin 作為內標 (internal control)

使用 PCR-RFLP 法分析 CYP1A1 基因型。取出從白血球中萃取的 DNA 1 μ g, 加入增幅所需的引子【表 1】、Tag 聚合酶 (Tag polymerase) 去氧核甘三磷酸 (dNTP) 聚合酶緩衝溶液與蒸餾水共 50 μ l。反應條件為 95 $^{\circ}$ C、4 分鐘使雙股 DNA 變性, 其次以 94 $^{\circ}$ C、25 秒; 60 $^{\circ}$ C、25 秒; 72 $^{\circ}$ C、25 秒的條件循環反應 35 次, 最後設定 72 $^{\circ}$ C、6 分鐘使產物反應更完全。

第二次 PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C、4 分鐘作為預變性 (prenatural); 94 $^{\circ}$ C、25 秒; 66 $^{\circ}$ C、25 秒; 72 $^{\circ}$ C、25 秒的條件循環反應 35 次, 最後設定 72 $^{\circ}$ C、6 分鐘。在 PCR 產物內加入 Msp I 限制酶、限制酶液及蒸餾水, 共 20 μ l, 並置於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽內 3 小時。再以 3% agarose gel 進行電泳分析。

第一次聚合酶鏈鎖反應產物為 413bp, 第二次反應產物為 295bp。CYP1A1 Msp I 型野生型 (wild-type) 兩條對偶基因均不含 Msp I 限

制酶切割點，故電泳結果只有一個 DNA 片段，其長度為 295bp。若屬於變異型 (variant) 的同質合子 (變異/變異型)，因兩個對偶基因都含有 Msp I 限制酶切割點，故可切成兩個較短的 DNA 片段：135 bp 與 160 bp。若同時出現 295bp、160 bp 與 135 bp 的 DNA 片段則為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子 (野生/變異型)。

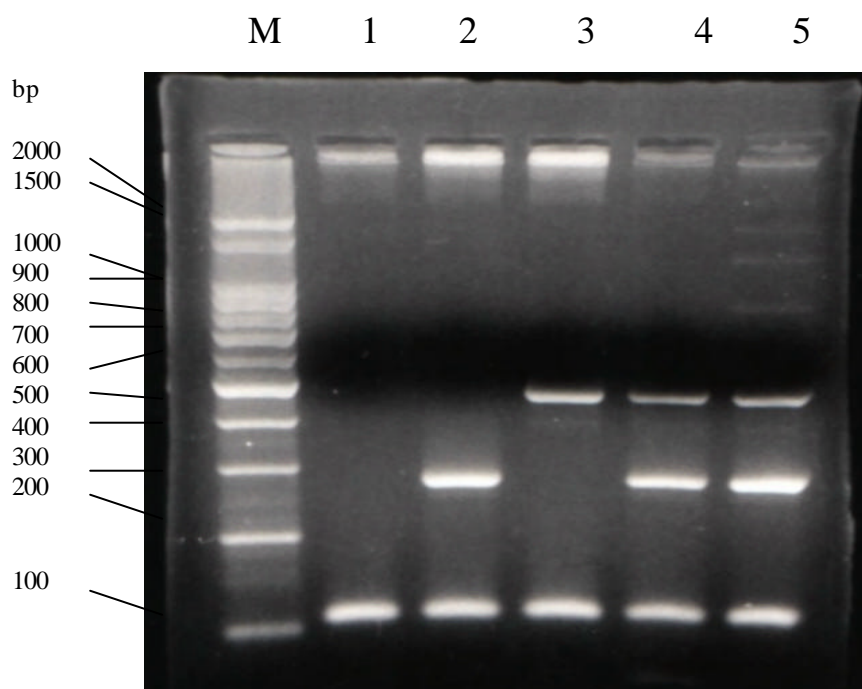


M : Marker ; 1 : 第一次 PCR 產物 , 413bp ; 2 : CYP1A1MspI 野生/野生型 , 295bp ; 3 : CYP1A1MspI 變異/野生型 , 295bp、160bp、135bp ; 4、5 : CYP1A1MspI 變異/變異型 , 160bp、135bp

GSTM1 及 GSTT1 基因型是以聚合酶鏈鎖反應分析。由白血球中萃取的 DNA 100 ng，加入增幅所須之引子【表 1】、Tag 聚合酶 (Tag polymerase)、去氧核甘三磷酸 (dNTP)、聚合酶緩衝溶液與蒸餾水共 50 μl。反應條件為 95 °C、4 分鐘使雙股 DNA 變性，其次以 94 °C、1 分鐘；63 °C、1 分鐘；72 °C、1 分鐘的條件循環反應 30 次，最後設定 72 °C、6 分鐘使產物反應完全。GSTM1 與 GSTT1 可同時進行反應，並以 β-globin 作為內標 (internal control) 幫助判斷聚合酶鏈鎖反應

是否良好，不論樣本是否帶有完整之 GSTM1 或 GSTT1 基因，均會產生 100bp 的 α -globin 基因片段。

若 GSTM1 及 GSTT1 基因有缺失，則特定序列的引子無法與 DNA 模板 (templet) 產生重旋，若沒有基因缺失，則可經增幅步驟產生 DNA 片段。若樣本 GSTM1 為非無效型，則可得到 273bp DNA 片段的 GSTM1 產物，如果樣本 GSTT1 為非無效型，則可得到 480bp DNA 片段的 GSTT1 產物。



M: Marker; 1: GSTM1、GSTT1 均為無效型; 2: GSTM1 為非無效型 (273bp), GSTT1 為無效型; 3: GSTM1 為無效型, GSTT1 為非無效型 (480bp); 4、5: GSTM1 為非無效型 (273bp), GSTT1 為非無效型 (480bp)。每個樣本都應產生 α -globin (100bp)。

NAT2 基因型是使用限制片段長度多型性 (PCR-RFLP) 檢測。將 DNA 1 μ g，加入增幅所須之引子【表 1】、Tag 聚合酶 (Tag polymerase)、去氧核甘三磷酸 (dNTP)、聚合酶緩衝溶液與蒸餾水共

50 μ l。反應條件為 95 $^{\circ}$ C、4 分鐘使雙股 DNA 變性，其次以 94 $^{\circ}$ C、1 分鐘；52 $^{\circ}$ C、1 分鐘；72 $^{\circ}$ C、1 分鐘的條件循環反應 30 次，最後設定 72 $^{\circ}$ C、6 分鐘。使產物反應更完全。

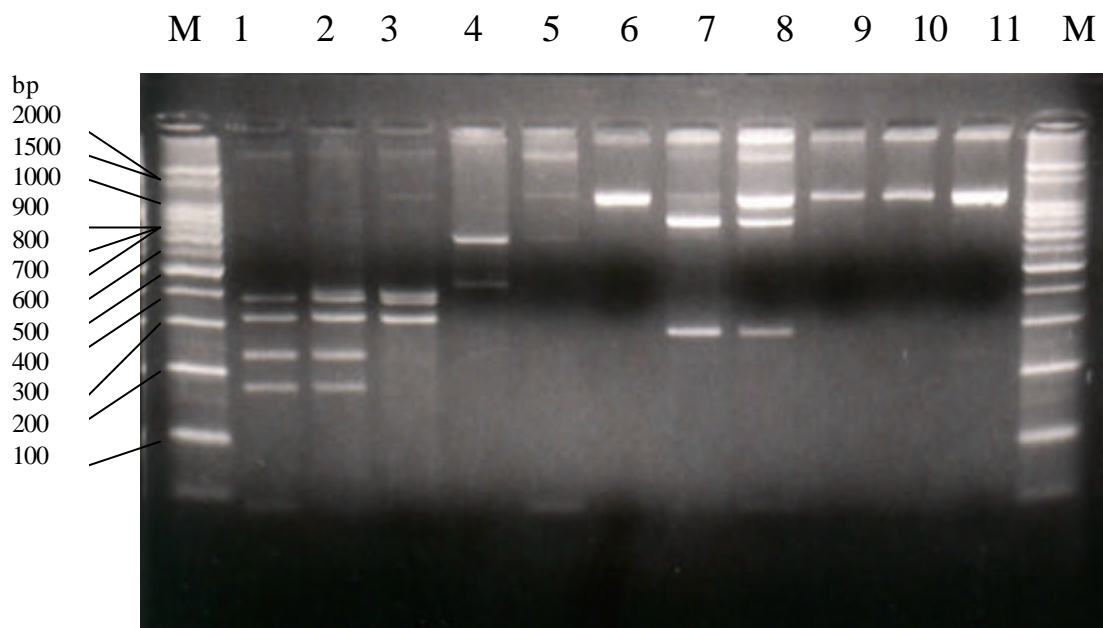
在 PCR 產物內分別加入 Kpn I、Taq I 與 BamHI 限制酶、限制酶反應液及蒸餾水總共 20 μ l。各以 37 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、30 置於水浴槽內 3 小時，使反應更完全。再以 3% agarose gel 進行電泳分析。NAT2 野生型為 NAT2*4，同質合子之野生型 (wild-type) 兩條對偶基因都可被三種限制酶作用。

Kpn I 型為 NAT2*5 (M1 allele)，在 C481T 產生取代，若樣本為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子，則只有一個對偶基因含 Kpn I 限制酶切割點，因此應同時出現 1093bp、659bp 與 443bp 三個 DNA 片段，若樣本屬於同質合子之變異型 (variant)，兩個對偶基因均無 Kpn I 限制酶切割點，故只有一段較長的 1093 bp DNA 片段。

Taq I 型為 NAT2*6 (M2 allele)，在 G590A 產生取代，若樣本為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子，會同時出現 395bp、381bp、326bp、226bp 與 169bp 五個 DNA 片段，若樣本屬於變異型 (variant) 的同質合子，則會出現 395bp、381bp 與 326bp 三個 DNA 片段。

BamHI 型為 NAT2*7 (M3 allele)，在 G857A 產生取代，若樣本為帶有一個變異型 (variant) 的異質合子，則只有一個對偶基因有 BamHI 限制酶切割點，因此應同時出現 1092bp、819bp 與 283 bp 三個 DNA 片段，若樣本屬於變異型 (variant) 的同質合子因兩個對偶

基因無 BamHI 限制酶切割點，只有一段較長的 1092bp DNA 片段。



M : Marker ; 1 : Taq I 野生/野生型 , 381 bp、326 bp、226 bp、169 bp ; 2 : Taq I 野生/變異型 , 395 bp、381 bp、326 bp、226 bp、169 bp ; 3 : Taq I 變異/變異型 , 395 bp、381 bp、326 bp、4 : Kpn I 野生/野生型 , 659 bp、443 bp ; 5 : Kpn I 野生/變異型 , 1093 bp、659 bp、443 bp ; 6、10 : Kpn I 變異/變異型 , 1093 bp ; 7 : BamHI 野生/野生型 , 819 bp、283 bp ; 8 : BamHI 野生/變異型 , 1092 bp、819bp、283 bp ; 9、11 : BamHI 變異/變異型 , 1092 bp

如果 NAT2 兩條對偶基因均為野生型或只有一條對偶基因為變異型，則歸類為 NAT2 快型，若兩條對偶基因均為變異型，歸類為慢型。乳癌患者與健康對照組的 NAT2 基因型分佈顯示於表二。

(3) DNA-Protein Crosslinks

以細胞分離液 (Histopaque) 分離單核球細胞，使用磷酸緩衝液清洗細胞後，每個樣本計數 2×10^6 個細胞加入 0.5ml【0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) 及 20mM Tris-HCl (PH=7.5)】溶液，冰存於 -70 ，直到分析為止。

使用前需解凍，用 22 號針頭抽吸 4 次，以機械性方式使 DNA 成為片斷，再加入 0.5ml【100mM KCl, 20mM Tris (PH=7.5)】溶液，放入乾浴器 (Dry Bath) 65°C ，10 分鐘、取出置於冰上 5 分鐘，之後離心 6,000rpm, 4°C ，5 分鐘。捨去上清液後，加入 1ml【100mM KCl, 20mM Tris (PH=7.5)】溶液，再次加熱 65°C ，10 分鐘，置於冰上 5 分鐘，離心 6,000rpm, 4°C ，重複兩次。以化學性方法促進 K-SDS 形成，並利用離心分離出有結合蛋白質的 DNA 及游離的 DNA。加入 0.2 mg/ml proteinase K 於 0.5ml【100mM KCL, 20mM Tris-HCl (PH=7.5) 及 10mM EDTA】溶液，放入 50 水浴槽加熱，反應 3 小時 再加入 0.5 ml 4mg/ml bovine serum albumin (BSA), 在 4°C 以 12,000rpm 離心 10 分鐘。

使用核酸濃度測定儀 (DyNA Quant 200 Fluorometer) 進行分析。以 Hoechst 33258 螢光劑配置溶液，先加入 $1 \mu\text{g/ml}$ Calf Thymus DNA 作為 DNA 標準品進行校正。再放入定量樣本以測得正確的數值。將測得結果除以 2×10^6 個細胞的 DNA 總量，即為 DPC 值 (%)。

公式：

$$\text{DPC \%} = \text{DNA-Protein crosslinks} / \text{DNA 總量} (\%)$$

三、統計方法

使用 SAS 6.12 統計軟體分析乳癌患者與對照組乳癌的風險因子如初經年齡、停經年齡等，CYP1A1、GSTM1、GSTT1 及 NAT2 多型性基因與 DPC 值等變項的分佈情形，並計算相對危險性及其 95% 信賴區間，再以卡方檢定 (χ^2 -test) 分析是否呈分佈上的顯著差異，進一步再以「是否患有乳癌」為依變項 (dependent variable)，其餘變項為自變項 (independent variable)，利用對數迴歸 (logistic regression) 作多重危險因子多變項迴歸分析。

四、使用藥劑

(1) 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

1. GenoMaker reagent (Blossom, Taiwan)
2. 1X RBC lysis buffer (Blossom, Taiwan)
3. choloform (Merck, Taiwan)
4. Isopropanol (Merck, Taiwan)
5. 70% ethanol
6. Agarose (Sigma, USA)
7. Ethidium Bromide (Sigma, USA)
8. 1.5 mM 10X 聚合酶緩衝溶液 (Protech, Taiwan)
9. 2.5 mM 去氧核甘三磷酸 (dNTP) (Protech, Taiwan)
10. 引子【表一】 (PE Biosystems, Taiwan)
11. Tag 聚合酶 (Tag polymerase) (Protech, Taiwan)
12. Msp I restriction enzyme (Promega, USA)
13. Kpn I restriction enzyme (Takara, Japan)
14. Taq I restriction enzyme (Takara, Japan)
15. BamHI restriction enzyme (Promega, USA)
16. RE 10X buffer (Protech, Taiwan)
17. BSA (bovine serum albumin) (Promega, USA)
18. 100bp Ladder (Protech, Taiwan)
19. 1X TBE buffer (Amresco)
20. Tris (J.T Baker)

(2) DNA-Protein Crosslinks

1. 細胞分離液 (Histopaque) (Sigma,USA)
2. Calf Thymus DNA Standard (amersham pharmacia biotech)
3. Hoechst (H33258) fluorescent Dye (Sigma,USA)
4. sodium dodecyl sulfate (東京化成工業株式會社,Japan)
5. HCl (Merck, Taiwan)
6. EDTA
7. NaOH
8. PBS (Iatrum)
9. BSA
10. TNE buffer

五、試驗材料

- 1.紫頭採血管 (EDTA)
- 2.綠頭採血管 (Heparin)
- 3.22 號真空採血針
- 4.22 號針頭
- 5.2.5ml 針筒
- 6.15ml 離心管
- 7.燒杯 (100ml,250ml,500ml,1000ml)
- 8.乳頭吸管
- 9.計數盤
10. 量筒 (100ml,250ml,500ml,1000ml)
11. 試管架
12. reach pipet tips (白、黃、藍)
13. 石英比色管
14. 微量離心管(0.6ml, 0.8ml, 1.5ml)

六、使用儀器

1. 高速離心機(Kubota 5100,1300)
- 2.4 雙門冰箱
3. 恆溫水浴槽 Firstek Scientific
4. DNA Thermal Cycler 2400 (Perkin Elmer)
5. 電泳槽 Mini Gel Migration Trough (Cosmo-Bio)
- 6.-20 冰櫃(Caravell)
7. PH meter 320 (Corning)
8. Mettler Toledo AG245
9. Type 16700 Mixer
10. Nikon Type 104
11. Polaroid 簡易型照相系統
12. Model TC-312A Transilluminator (312nm Ultraviolet)
13. 核酸濃度測定儀 (DyNA Quant 200 Fluorometer) (Hoefer)
14. 乾浴器 Dry Bath (Boekel)

第四章、結果

表一為乳癌患者與對照組的基本特性，乳癌患者的平均年齡為 46.7 歲，對照組為 47.3 歲，兩者無統計上顯著差異 ($p=0.75$)，初經年齡在 13 歲以下者的相對危險性為 13 歲以上的 2.1 倍，達統計上的顯著意義 ($p<0.05$)。在停經年齡方面，乳癌患者平均為 50 歲，對照組為 51 歲，兩組無統計上的顯著差異 (資料沒有顯示)。未曾哺乳的相對危險性為哺乳的 3.5 倍，達統計上的顯著意義 ($p<0.05$)。使用口服避孕藥的相對危險性為無使用者的 4.5 倍 ($p<0.05$)，具統計上顯著差異。另外在教育程度、身體質量指數、第一胎足月生產年齡、足月生產數與使用荷爾蒙補充療法等作分析比較，發現兩組間均無統計上顯著差異。把危險因子以對數迴歸 (logistic regression) 作多變項分析，初經年齡 13 歲以下的相對危險性為 13 歲以上的 3.2 倍，停經後婦女相對危險性為停經前的 4.7 倍，未曾哺乳的相對危險性為哺乳的 9.1 倍，均達統計上的顯著意義 ($p<0.05$)。其他如教育程度、身體質量指數、第一胎足月生產年齡、足月生產數與使用荷爾蒙及口服避孕藥等變項在兩組間則無統計相關。

表二為 NAT2 基因型在乳癌患者組與健康對照組的分佈。NAT2 被區分為快型與慢型，NAT2 快型可細分成四種基因型，在乳癌病患組中，帶有 NAT2*4 / NAT2*4 型有 23 人，NAT2*5 / NAT2*4 型有 4 人，NAT2*6 / NAT2*4 型有 9 人，NAT2*7 / NAT2*4 型有 9 人，健康對照組 NAT2*4 / NAT2*4 型有 18 人，NAT2*5 / NAT2*4 型有 2 人，NAT2*6 / NAT2*4 型有 16 人，NAT2*7 / NAT2*4 型有 11 人。NAT2 慢型可細分成 5 種基因型，乳癌病患組中帶有 NAT2*5 / NAT2*5 型有

5 人，NAT2*6 / NAT2*6 型有 3 人，NAT2*7 / NAT2*7 型有 2 人，NAT2*5 / NAT2*7 型有 1 人，NAT2*6 / NAT2*7 型有 4 人，健康對照組 NAT2*5 / NAT2*5 型有 1 人，NAT2*6 / NAT2*6 型有 2 人，NAT2*7 / NAT2*7 型有 3 人，NAT2*5 / NAT2*1 型有 1 人，NAT2*6 / NAT2*7 型有 6 人。

易感性多型性基因之分佈與比較顯示於表三，在乳癌患者中帶有 CYP1A1 同質合子及異質合子之野生型頻率為 83.3%，同質合子之變異型為 16.7%，NAT2 快型頻率為 75.0%，慢型為 25.0%，GSTM1 非無效型為 43.3%，無效型為 56.7%，GSTT1 非無效型為 55.0%，無效型為 45.0%。在健康對照組中，帶有 CYP1A1 同質合子及異質合子之野生型頻率為 81.7%，同質合子之變異型為 18.3%，NAT2 快型頻率為 78.3%，慢型為 21.7%，GSTM1 非無效型為 58.3%，無效型為 41.7%，GSTT1 非無效型為 56.7%，無效型為 43.3%，上述以卡方檢定分析均未達統計上顯著差異。進一步把四種多型性基因以對數迴歸（logistic regression）作多變項分析，CYP1A1 Msp I 型的相對危險性為野生型的 0.9 倍，NAT2 慢型相對危險性為快型的 1.1 倍，GSTM1 無效型的相對危險性為非無效型的 1.8 倍，GSTT1 無效型的相對危險性為非無效型的 1.0 倍。以上均未達統計上顯著差異。

表四為對表一有統計上顯著相關的危險因子及四種基因型以對數迴歸（logistic regression）作多變項分析。初經年齡 13 歲以下的相對危險性為 13 歲以上者的 2.8 倍，停經後婦女相對危險性為停經前的 3.0 倍，未曾哺乳的相對危險性為哺乳的 5.6 倍，使用口服避孕藥的相對危險性為使用口服避孕藥者的 3.2 倍，均達統計上的顯著意義。但四種多型性基因在兩組間仍無統計上之顯著差異。

在排除家族病史及抽煙等干擾因子後，表六顯示乳癌病人的 DPC 值為 1.6%，對照組 DPC 值為 1.0%，具有統計上的顯著差異（ $P<0.001$ ）。以停經前後分層，停經前乳癌病患的 DPC 值為 1.6%，對照組 DPC 值為 1.0%，具有統計上的差異（ $P<0.001$ ）。停經後乳癌病患 DPC 值為 1.7%，對照組 DPC 值為 1.0%，同樣具統計上的顯著差異（ $P<0.001$ ）。但比較乳癌病患或健康對照組之停經前後 DPC 值，發現均無統計上的顯著差異。於圖一可明顯看出乳癌患者的 DPC 值顯著高於對照組。若以停經期區分，則無論停經前、停經後之乳癌患者 DPC 值均顯著高於健康對照組（如圖二）。

表六為乳癌患者疾病分期 DPC 值在各組間與對照組的差異。第一期與第二期為 1.6%，第三期為 1.7%，而對照組 DPC 值為 1.0%，以上三期與對照組比較均具有統計上的顯著差異（ $P<0.001$ ）。以疾病分期比較乳癌病患的 DPC 值，發現各期之間均無統計上的顯著差異。圖三可明顯看出乳癌患者三期之各 DPC 平均值均顯著高於對照組。但各期間並無顯著差異。

表七為基因型與 DPC 值之比較，乳癌患者之 DPC 值在 CYP1A1 Msp I 野生型為 1.6%，變異型同質合子為 1.8%，NAT2 快型為 1.6%，慢型為 1.7%，GSTM1 非無效型為 1.7%，無效型 DPC 值為 1.6%，GSTT1 非無效型為 1.6%，無效型 DPC 值為 1.7%，上述基因型以 t-test 檢定均未達統計上顯著差異。健康對照組之 DPC 值，其 CYP1A1 Msp I 野生型為 1.0%，變異型同質合子為 1.0%，NAT2 快型 DPC 值為 1.0%，慢型 DPC 值為 0.9%，而 GSTM1 與 GSTT1 基因型無論是非無效型或無效型均為 1.0%，上述基因型以 t-test 檢定未發現有統計上的差異。

DPC 與乳癌相關危險因子之多變項複迴歸分析顯示於表八，在相關的危險因子中除了疾病變項（乳癌病患組 / 健康對照組）有統計上顯著差異（ $p < 0.01$ ）之外，其他變項均無統計上顯著相關性。（ $R^2 = 0.47$ ）再以逐步迴歸法（stepwise）作多變項迴歸分析，則只有疾病變項留於迴歸模型（model）中（ $R^2 = 0.42$ ）。

第五章、討論

本研究以病例對照研究方式探討乳癌的相關危險因子，在初經年齡方面，根據 1967 年的病例對照研究中，發現台灣婦女的初經年齡較晚者，罹患乳癌的危險性較低⁽⁵⁷⁾。本研究亦顯示初經年齡在 13 歲以下者為 13 歲以上婦女的 2.1 倍。在哺乳方面，依據 1985 年台北市的社區病例對照研究中，發現有哺乳者罹患乳癌的危險性是不哺乳者的 0.2 倍⁽⁵⁸⁾，而本研究亦顯示不哺乳者的相對危險性為哺乳者的 3.5 倍，在口服避孕藥方面，由結果呈現出服用口服避孕藥者其相對危險性比沒有服用者高出 4.5 倍。因此，由本研究可看出初經年齡較晚、有哺乳及沒有服用口服避孕藥對婦女具有保護作用。

環境與遺傳的交互作用是乳房癌化過程的重要因素。近年來由於工業化及經濟發展的結果，環境中普遍存在著各式各樣的空氣污染物，因此，不論是在 *in vitro* 實驗、動物模式及人類研究，有兩種化合物（PAHs 及芳香胺）被發現與乳癌有相關⁽⁵⁹⁻⁶²⁾。在 *in vitro* 實驗，顯示 PAHs 會引起乳房上皮細胞株（cell lines）發生轉形（transformation）⁽⁵⁹⁾。在動物實驗方面，暴露於 PAHs（例如 benzo(a)pyrene 等）會誘發大白鼠乳腺產生腫瘤⁽⁶⁰⁾。人類暴露於環境中 PAHs 會增加乳癌的發生率⁽⁶¹⁾。另一方面，代謝致癌物酵素之遺傳多型性是造成個體是否易罹患癌症的一個因素，例如 CYP1A1 MspI 變異型與肺癌、乳癌等有關連^(63,64)。肺癌病患約有 15% 帶有 MspI 變異/變異型，這個同質合子（homozygotes）會增加酵素的活性⁽⁶⁵⁾。在日本人中，帶有 CYP1A1 MspI 變異型的人，會因為抽菸而誘發癌症的相對危險性為不抽菸者的 7 倍⁽⁶⁶⁾。Taioli 等人(1995)⁽³⁸⁾報告 MspI

變異型與白種人婦女乳癌無關，但卻會增加美國黑人婦女罹患乳癌的風險，且其相對危險性為 9.7 倍。在台灣，Huang 等人 (1999)⁽⁶⁴⁾ 發現 MspI 變異型和乳癌婦女有關，帶有同質合子之變異型罹患乳癌的風險高於異質合子的 2 倍。本研究在 60 個乳癌病患中只有一人有抽菸，故無法比較其基因型與抽菸的相關性。但分析比較乳癌與 CYP1A1 MspI 變異型的關係，發現二者間無關連。此結果與 Ishibe 等人 (1998)⁽²⁹⁾ 以 466 名乳癌患者的研究顯示 MspI 變異型與乳癌間無統計上的相關性是一致的。MspI 變異型的分佈在本研究乳癌患者為 16.7%，對照組為 18.3%，其比率與亞洲人接近 (大於 10%)⁽⁶⁴⁾。

GST M1 多型性對個體罹患癌症風險具有差異性，GSTM1 無效型會增加肺癌^(63,67)、大腸癌⁽⁶⁸⁾、膀胱癌^(68,69)與乳癌⁽⁶⁹⁾的發生率。Helzlsouer 等人 (1998)⁽⁴⁴⁾ 的研究顯示 GSTM1 無效型與乳癌具有相關性，在停經後婦女更顯著。Charrier 等人 (1999)⁽²¹⁾ 指出 50 歲以上的婦女，其 GSTM1 無效型與乳癌間具有相關性。Ambrosone 等人 (1995)⁽⁴⁰⁾ 報告 GSTM1 無效型雖然不會增加罹患乳癌的危險性，但會提高較早停經婦女的危險性。本研究比較乳癌患者/對照組及停經前/後婦女與 GSTM1 無效型間的關係，發現彼此與基因型間均無關連。GSTM1 無效型在台灣人的比率為 57.0%⁽²⁷⁾，而本研究在乳癌患者為 56.7%，對照組為 41.7%，這個分佈與以前的研究類似。Zhong 等人 (1994)⁽⁶⁹⁾ 的資料顯示 GSTM1 無效型在病例組與對照組的分佈各為 47.7% 與 42.0%，二者無統計上的差異。本研究乳癌患者之 GSTM1 無效型頻率比對照組增加 15.0%，且其相對危險性為非無效型的 1.8 倍，但未達統計上的顯著差異。

GSTT1 無效型會增加致癌物對 DNA 損傷⁽⁷⁰⁾，亦會增加星細胞癌 (astrocytoma) 及腦膜癌 (meningioma)⁽⁷¹⁾ 的風險，但與基底細胞癌 (basal cell carcinoma) 無關⁽⁷²⁾。另有研究顯示 GSTT1 無效型普遍的存在於早期被診斷出大腸癌的病人，暗示著 GSTT1 無效型可能會影響罹患大腸癌的發病年齡，但 GSTM1 無效型對大腸癌則不具有危險性⁽⁷³⁾。到目前為止，有關 GSTT1 的研究沒有任何報告顯示與乳癌有關。本研究亦沒有發現帶有 GSTT1 無效型的個體會增加罹患乳癌的風險。而 GSTT1 無效型的比率在本研究乳癌患者為 45.0%，對照組為 43.3%，這個比值與以前的研究顯示在台灣人為 49.8%⁽²⁷⁾ 類似。Bailey 等人 (1998)⁽³⁶⁾ 將 CYP1A1、GSTM1 及 GSTT1 三種多型性基因，不論單獨或合併與乳癌婦女做分析比較，發現均無相關。

NAT2 多型性與發展成某些癌症有關，慢型與膀胱癌有關^(74,75)，而快型與大腸癌有關⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾。NAT2 表現型與乳癌易感性個體的研究出現不一致的結果。最近的研究大多集中在 NAT2 快型/慢型或停經前/停經後婦女的比較。Agyndez 等人 (1995)⁽⁷⁹⁾ 評估 NAT2 多型性與罹患乳癌風險，發現 NAT2 慢型在乳癌病患的頻率是 53.0%，而對照組為 51.0%，當中有 7 人罹患小葉乳癌 (lobular breast cancer)，其基因型全部為快型。本研究分析 NAT2 基因型與乳癌間的相關性，發現與 Ambrosone 等人 (1996)⁽⁵⁰⁾ 及 Hunter 等人 (1997)⁽⁸⁾ 的研究類似，兩者無關連。NAT2 慢型的分佈變異相當大，從加拿大愛斯基摩人的 5.0% 到北非人的 90.0% 都有⁽⁸⁰⁾，例如葡萄牙人為 64.1%，蘇格蘭人為 65.0%，瑞典人為 70.0%⁽⁸¹⁾，土耳其人為 57.4%⁽⁸²⁾。本研究乳癌患者 NAT2 慢型比率為 25.0%，對照組為 21.7%，與過去的研究顯示台灣人為 21.1%⁽⁸³⁾ 近似。

在生物細胞中，由於化學物質與放射線所產生的自由基會形成 DPC，氫氧根離子(OH[·])可能是主要的起始物種(initiating species)，它會使 DNA 或蛋白質形成自由基（例如：DNA[·] 或 Protein-SH[·] adducts）⁽⁸⁴⁾。DNA-adduct 與乳癌婦女之多型性基因的研究有很多，依 Millidan 等人 (1998)⁽¹⁵⁾ 指出帶有 NAT2 慢型的乳癌婦女，其 DNA-adduct 值顯著高於快型，而 Nielsen 等人 (1996)⁽⁸⁵⁾ 則發現帶有 GSTM1 無效型者，其 PAH-DNA adduct 值較高，但合併 NAT2 與 GSTM1 兩個基因與 DNA adduct 值比較，二者間無統計上的差異。Topinka 等人(1997)⁽⁸⁶⁾ 研究亦顯示 DNA-adduct 在 GSTM1 無效型顯著較高，與 NAT2 基因多型性無關。但有關乳癌婦女與其多型性基因和 DPC 間的研究還沒有。本研究比較 CYP1A1、GSTM1、GSTT1 及 NAT2 四種基因型與 DPC 間的關係，發現均無相關。

暴露於環境污染物，例如：重金屬⁽⁸⁷⁾、環氧乙烷 (ethylene oxide)⁽⁸⁸⁾及構成香菸成分的甲醛 (formaldehyde)^(89,90)與乙醛 (acetaldehyde)⁽⁹¹⁾等；及化學治療劑，例如：環磷酸胺 (cyclophosphamide)^(92,93)、氮芥 (nitrogen mustard)⁽⁹⁴⁾等會誘發 DPC 形成，這些物質與發展成骨髓凹陷 (bone marrow depression) 及急性骨髓性白血病有關。Taioli 等人 (1995)⁽⁸⁷⁾ 的資料顯示 DPC 與年齡、抽煙、身體質量指數、性別或種族不具有相關性。Voitkun 及 Zhitkovich(1999)⁽⁹⁵⁾ 的研究亦有相同的結果。甲醛為香煙成分之一，若抽煙則表示會暴露於甲醛，Shaham 等人(1996)⁽⁹⁶⁾ 的研究顯示人類白血球暴露於甲醛後，其 DPC 值高於對照組，且 DPC 值與暴露量呈線性相關。Taioli 等人 (1995)⁽⁸⁷⁾ 指出 DPC 可作為低劑量且長期暴露於鉻 (Cr) 的生物指標。在哺乳類動物會因暴露於甲醛、紫外線、離子或非離子射線或金屬化合物如砷、鉻、鎳等，而造成細胞內 DPC 值增加^(17,54,87,97)。Lei 等人(1995)

⁽¹⁶⁾指出修復 DPC 的時間與過程比其他 DNA 損傷（如單股斷裂等）還要緩慢，並會因此中斷基因表現及染色體結構，造成 DNA 在複製時鹼基的缺失。在老鼠的肺細胞及白血球顯示鎳（Ni）暴露與 DPC 有劑量反應關係（dose-dependent relationship）⁽¹⁶⁾。本研究首次以 DPC 作為生物指標探討乳癌婦女細胞內 DNA 損傷程度，在排除家族病史及抽煙等干擾因子後，比較乳癌病例組與健康對照組之 DPC 值，發現兩者間具有統計上的顯著差異（ $P < 0.001$ ）。在對照組之 DPC 值，本研究為 1.0%，介於 Taioli 等人（1995）⁸⁷ 的 0.8 % 及 Costa 等人（1993）⁽¹⁸⁾ 的 1.2 % 之間。

第六章、結論

過去研究顯示 CYP1A1、GSTM1、GSTT1 及 NAT2 四種多型性代謝基因與癌症有關，但本研究並未發現乳癌患者之多型性基因與健康對照組間具有差異。在另一方面，由資料顯示乳癌患者之 DPC 值明顯高於健康對照組，此結果顯示 DPC 值可反應乳癌患者的 DNA 損傷程度 (level)。

第七章、參考文獻

1. 沈志陽 (2000) 台灣乳癌的研究, 科學發展月刊第 28 卷第 9 期: 675-678
2. 行政院衛生署, <http://www.doh.gov.tw/>
3. 季瑋珠, 張金堅 (2001) 台灣的乳癌, 台灣醫學會, 本土醫學資料庫 <http://fma.mc.ntu.edu.tw/data/index.html>
4. Cotran 著, 黃鎮國、賴宗鼎等編譯 (1992) 羅賓氏病理學, 藝軒, 第一版
5. 侯瑞城等著 (1996) 醫護病理學, 華杏出版, 第三版
6. 陳啟明 (2000) 長春月刊 89 年 11 月號: 106-112
7. 黃思誠 (1998) 婦科腫瘤學, 華香園出版社
8. Hunter DJ, Hankinson SD, Hough H, Gertig DM, Closas MG, Spiegelman D, Manson JAE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Kelsey K (1997) A prospective study of NAT2 acetylation genotype, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 18: 2127-2132
9. Gould MN, Cathers LE, Moore CJ (1982) Human breast cell-mediated mutagenesis of mammalian cells by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 42: 4619-4624
10. Eldridge S, Gould MN, Butterworth BE (1992) Genotoxicity of environmental agents in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 52: 5617-5621
11. Obena H, Hori S, Kahimoto L, Kunita N (1981) Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 23-27
12. Martin FL, Carmichael PL, Crofon-Sleigh C, Venitt S, Phillips DH, Grover PL (1996) Genotoxicity of Human mammary lipid. *Cancer Res.* 56: 5342-5346
13. Katho T, Nagata N, Kuroda Y, Itoh H, Kawahara A, Kuroki N, Ookuma R, Bell DA (1996) Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 17: 1855-1859
14. Falck GCM, Hirconen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research* 441: 225-237

15. Millidan RC, Pittman GS, Newman B, Tse CKJ, Selmin O, Rockhill B, Savitz D, Morrman PG, Bell DA (1998) Cigarette Smoking, N-acetyltransferases 1 and 2, and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Precention* 7: 371-378
16. Lei YX, Zhang Q, Zhuang AZ (1995) Study of DNA-protein cross-links induced by chromate and nickel compounds in vivo with 125I-postlabelling assay. *Mutation Research* 329: 197-203
17. Chen Y, Cohen MD, Snow ET, Costa M (1991) Alteration in restriction enzyme digestion patterns detects DNA-protein complexes induced by chromate. *Carcinogenesis* 12: 1575-1580
18. Costa M, Zhitkovich A, Toniolo P (1993) DNA-Protein Cross-Links in Welders : Molecular Implications. *Cancer Research* 53: 460-463
19. Schoenfeld HA, Witz G (1999) DNA-Protein cross-link levels in bone marrow cells of mice treated with benzene or trans, trans-muconaldehyde. *Journal of toxicology and Environmental Health Part A* 56: 379-395
20. Ramirez P, Razo LMD, GutierrezRuiz MC and Gonsebatt ME (2000) Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* 21: 701-706
21. Charrier J, Maugard CM, Mevel BL, Bignon YJ (1999) Alleotype influence at glutathione S-transferase M1 locus on breast cancer susceptibility. *British Journal of Cancer* 79: 346-353
22. Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR (2000) Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer Letters* 153: 113-120
23. Coughlin SS, Piper M (1999) Genetic Polymorphisms and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Precention* 8: 1023-1032
24. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PSP, Teare MD, Ponder BAJ, Easton DF (1999) A System Review Of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Precention* 8: 843-854
25. Lo YL, Yu JC, Huang CS, Tseng SL, Chang TM, Chang KJ (1998) Allellic loss of the BRCA1 and BRCA2 genes and other regions on 17q and 13q in breast cancer among women from Taiwan (Area of low incidence but early onset). *Int. j. Cancer (Pred. Oncol.)* 79: 580-587
26. Maugard CM, Charrier J, Bignon YJ (1998) Allelic deletion at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility. *Chemico-biological interactions* 111-112: 365-375

27. 王克揚, 林肇堂, 陳建仁, 謝玲玲 (1998) 癌症感受性基因之基因型與胃癌的相關性研究, 中華衛誌 17, No.3
28. Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ (1994) Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 15(12): 2961-2963
29. Ishibe N, Hankinson SE, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Speizer FE, Kelsey KT, Hunter DJ (1998) Cigarette smoking, Cytochrome P450 1A1 polymorphisms, and Breast Cancer Risk in the Nurses' Health Study. *Cancer Research* 58: 667-671
30. Roth MJ, Dawsey SM, Wang GQ, Tangrea JA, Zhou B, Ratnasinghe D, Woodson KG, Olivero OA, Poirier MC, Frye BL, Taylor PR, Weston A (2000) Association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China. *Cancer Letters* 156: 73-81
31. Kristensen VN, Børresen-Dale AL (2000) Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutation Research* 462: 323-333
32. Lear JT, Heagerty AHM, Smith A, Boers B, Payne CR, Smith CAD, Jones PW, Gilford J, Yengi L, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC (1996) Multiple cutaneous basal cell carcinomas : Glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphisms influence tumour numbers and accrual. *Carcinogenesis* 17: 1891-1896
33. Lippert TH, Seeger H, Mueck AO (2000) The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis. *Steroids* 65: 357-369
34. Topic E, Stefanovic M, Ivanisevic AM, Petrinovic R, Curcic I (2000) The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene polymorphism among breast and head and neck cancer patients. *Clinica Chimica Acta* 296: 101-109
35. Fontana X, Peyrottes I, Rossi C, LeblancTalent P, Ettore F, Namer M, Bussiere F (1998) Study of the Frequencies of CYP1A1 gene polymorphisms and glutathione S-transferase mu1 gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases. *Mutation Research* 403: 45-53
36. Bailey LR, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF (1998) Breast Cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: Evidence of a Lack of Association in Caucasians and African Americans. *Cancer Research* 58: 65-70
37. Kihara M, Kihara M, Noda K (1995) Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis* 16(10): 2331-2336

38. Taioli E, Trachman J, Chen X, Toniolo P, and Garte SJ (1995) A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. *Cancer Res.* 55: 3757-3758
39. Zhang ZY, Fasco MJ, Huang L, Guengerich FP, Kaminsky LS (1996) Characterization of purified human recombinant Cytochrome P4501A1-Ile and -Val462: Assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res.* 56: 3926-3933
40. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Laughlin R, Nemoto T, Michalek AM, Harrington A, Ford TD, Shields PG (1995) Cytochrome P4501A1 and Glutathione S-Transferase (M1) genetic polymorphisms and Postmenopausal Breast Cancer Risk. *Cancer Research* 55: 3483-3485
41. Abney TO (1990) The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids* 64: 610-617
42. Pavanello S, Gabbani G, Mastrangelo G, Brougnone F, Maccacaro G, Clonfero E (1999) Influence of GSTM1 genotypes on anti-BPDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of humans exposed to PAH. *Int Arch Occup Environ Health* 72: 238-246
43. Gao Y, Zhang Q (1999) Polymorphisms of the GSTM1 and CYP2D6 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. *Mutation Research* 444: 441-449
44. Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, Strickland PT, Hoffman S, Alberg AJ, Watson M, Comstock GW, Bell D (1998) Association Between Glutathione S-Transferase M1, P1, and T1 Genetic Polymorphisms and development of Breast. *Journal of the National Cancer Institute* 90(7): 512-518
45. Pastorelli R, Guanci M, Cerri A, Negri E, Vecchia CL, Fumagalli F, Mezzetti M, Cappilli R, Panigalli T, Fanelli R, Airoidi L (1998) Impact of Inherited Polymorphisms in Glutathione S-Transferase M1, Microsomal Epoxide Hydrolase, Cytochrome P450 Enzymes on DNA, and Blood Protein Adducts of Benzo(a)pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7: 703-709
46. Quinones L, Berthou F, Varela N, Simon B, Gil L, Lucas D (1999) Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. *Cancer Letters* 141: 167-171
47. Duncan H, Swan C, Green J, Jones P, Brannigan K, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC (1995) Susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: interactions between glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Clinica Chimica Acta* 240: 53-61

48. Warwick A, Sarhanis P, Redman C, Pemble S, Taylor JB, Ketterer B, Jones P, Alldersea J, Gilford J, Yengi L, Fryer A, Strange RC (1994) Theta class Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia : interactions with GSTM1, CYP2D6, and smoking. *Carcinogenesis* 15: 2841-2845
49. Woolhouse NM, Qureshi MM, Bastaki SMA, Patel M, Abdulrazzaq Y, Bayoumi AL (1997) Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) genotyping of Emiratis. *Pharmacogenetics* 7: 73-82
50. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, Harrington AM, Shields PG (1996) Cigarette Smoking, N-Acetyltransferase Genetic Polymorphisms, and Breast Cancer Risk. *JAMA* 276: 1494-1501
51. Korpinen E, Froop PH, Rautio A, Madacsy L, Reunanen A, Baarala O, Akerblom HK (1999) N-Acetyltransferase-2 polymorphism, smoking and type 1 diabetic nephropathy. *Pharmacogenetics* 9: 627-633
52. Woolhouse NM, Qureshi MM, Bayoumi AL (1997) A new mutation C759T in the polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) gene. *Pharmacogenetics* 7: 83-84
53. Costa M, Zhirkovich A, Gargas M, Paustenbach D, Finley B, Kuykendall J, Billings R, Carlson TJ, Wetterhahn K, Xu J, Patierno S, Bogdanffy M (1996) Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein cross-links. *Mutation Research* 369: 13-21
54. Olin KL, Cherr GN, Rifkin E, Keen CL (1996) The effects of some redox-active metals and reactive aldehydes on DNA-protein cross-links in vitro. *Toxicology* 110: 1-8
55. Speit G, Schutz P, Merk O (2000) Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis* 15: 85-90
56. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett.* 263: 131-333
57. Lin TM, Chen KP, MacMahon B (1971) Epidemiologic characteristics of cancer of the breast in Taiwan. *Cancer* 27: 1497-1504
58. Chie WC, Chen CF, Lee WC, Chen CJ (1996) Socioeconomic status, lactation and breast cancer risk of parous women in Taiwan. *Oncology Reports* 3: 497-501
59. Calaf G, Russo J (1993) Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogen. *Carcinogenesis* 14: 483-492
60. Cavalieri N, Rogan E, Sinha D (1988) Carcinogenicity of aromatic hydrocarbons directly applied to rat mammary gland. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114: 3-9

61. Li D, Wang M, Dhingra K, Hittelman WN (1996) Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer res.* 56: 287-293
62. Russo J, Russo IH (1987) Biological and molecular basis of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest* 57: 112-137
63. Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A (1994) Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis (Lond)* 15:1785-1790
64. Huang CS, Shen CY, Chang KJ, Hsu SM, British HDC (1999) Cytochrome P4501A1 polymorphism as a susceptibility factor for breast cancer in postmenopausal Chinese women in Taiwan. *Journal of Cancer* 80(11): 1838-1843
65. Nakachi K, Hayashi SI, Kawajiri K (1993) Polymorphisms of the CYP1A1, glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer res.* 53: 2994-
66. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi SI (1993) Gram polymorphism of P53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis (Lond)* 14:1085-1089
67. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H (1993) The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis (Lond)* 14:1479-1481
68. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the Carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increase susceptibility to bladder. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1159-1164
69. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK (1994) Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 14: 1821-1824
70. Wienche JK, Pemble S, Ketterer B, Kelsey KT (1995) Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4: 253-259
71. Elexpuru-Carniruaga J, Buxton N, Kandula V, Dias PS, Campbell A, McIntosh J, Broome J, Junes P, Inslai P, Aldersea J, Fryer A, Stange RC (1995) Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6). *Cancer Res.* 55: 4237-4239

72. Yengi L, Inskip A, Gifford J, Aldersea J, Vailey L, Smith A, Lear J, Heagerty AH, Bowers B, Hand P, Haynes JD, Jones PW, Strange R, Fryer AA (1996) Polymorphism at the glutathione S-transferase locus GST interactions with cytochrome P450 and glutathione S-transferase genotypes as factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 56: 1974-
73. Chenevis-Trenchg, Young J, Coggan M, Board P (1995) Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset. *Carcinogenesis (Lond)* 16:1655-1657
74. Grimmer G, Naujack KW, Dettbarn G (1987) Gaschromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, aza-arenes, aromatic amines in the particle and vapor phase of mainstream and sidestream smoke of cigarettes. *Toxicol. Lett.* 35: 117-124
75. Hein DW (1988) acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 948: 37-66
76. Ilett KF, Dacid BM, Detchon P, Castleden WM, Kwa R (1987) Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 47: 1466-1469
77. Welfare MR, Cooper J, Bassendine MF, Daly AK (1997) Relationship between acetylator status, smoking, diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis* 18: 1351-1354
78. Wohlleb JC, Hunter CF, Blass B, Kadlubar FF, Chu DZ, Lang NP (1990) Aromatic amine acetyltransferase as a marker for colorectal cancer: environmental and demographic associations. *Int. J. Cancer* 46: 22-30
79. Agyndez JAG, Ladero JM, Olivera M, Abildua R, Roman JM, Benitez J (1995) Genetic Analysis of the Arylamine N-Acetyltransferase Polymorphism in Breast Cancer Patients. *Oncology* 52: 7-11
80. Evans PP (1989) N-acetyltransferase. *Pharmac. Ther.* 42: 157-234
81. Lemos MC, Regateiro FJ (1998) N-acetyltransferase genotypes in the Portuguese population. *Pharmacogenetics* 8: 561-564
82. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Roots I (1997) Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in a Turkish population. *Pharmacogenetics* 7:327-331
83. Huang CS, Chern HD, Shen CY, Hsu SM, Chang KJ (1999) Association between n-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic polymorphism and development of breast cancer in post-menopausal Chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. *Int. J. Cancer* 82: 175-179
84. Oleinick NL, Chiu S, Ramakrishnan N, Xue L (1987) The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br. J. Cancer* 55(Suppl. VIII): 135-140

85. Nielsen PS, Pater N, Okkels H, Autrup H (1996) Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers-Effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. *Carcinogenesis* 17: 1021-1027
86. Topinka J, Binková B, Mraèková G, Peterka V, Beneš I, Dejmek J, Lení èek J, Pilèík T, Āám RJ (1997) Influence of GSTM1 and NAT2 Genotypes on Placental DNA Adducts in an Environmentally Exposed Population. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 184-195
87. Taioli E, Zhitkovich A, Kinney P, Udasin I, Toniolo P, Costa M (1995) Increased DNA-Protein Crosslinks in Lymphocytes of Residents Living in Chromium -Contaminated Areas. *Biological Trace Element Research* 50: 175-180
88. Popp W, Vahrenholz C, Przygoda H, Brauksiepe A, Goch S, Nùller G, Schnell D, Norpoth K (1994) DNA-protein cross-links and sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes and hydroxyethyl mercapturic acid in urine of ethylene oxide-exposed hospital workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 66: 325-332
89. Casanova M, Deyo DF, Heck Hi A (1989) Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12: 397-417
90. Casanova M, Heck Hi A, Janszed D (1996b) Comments of "DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde-in vitro studies" by Shaham et al. *Carcinogenesis* 17: 2097-2101
91. Heck Hi A, Casanova M, Lam CW, Swenberg JA (1986) The formation of DNA-protein cross-links by aldehydes present in tobacco smoke. *Banbury Report 23, Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis* pp 215-230, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
92. Skare JA, Schrotel KR (1984) alkaline elution of rat testicular DNA: detection of DNA cross-links agter in vivo treatment with chemical mutagens. *Mutat. Res.* 130: 295-303
93. Wang JY, Prorok G, Vaughan WP (1993) Cytotoxicity, DNA cross-linking, and DNA single-strand breaks induced by cyclophosphamide in a rat leukemia in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol* 31: 381-386
94. DeNeve WJ, Evertt CK, Suminski JE, Valeriote FA (1988) Influence of WR2721 on DNA cross-linking by nitrogen mustard in normal mouse bone marrow and leukemia cells in vivo. *Cancer Res.* 46: 6002-6005
95. Voitkun V, Zhitkovich A (1999) Analysis of DNA-Protein Crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutation Research* 424: 97-106

96. Shaham J, Bohisteln Y, Meltzer A, Kaufman Z, Palma E, Ribak J (1996) DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde- in vitro and in vivo studies. *Carcinogenesis* 17: 121-125
97. Borges KM, Wetterhahn KE (1989) Chromium Cross-links glutathione and cysteine to DNA. *Carcinogenesis* 10: 2165-2168

表一 研究對象基本資料分佈

	乳癌病患組 (N=60)	健康對照組 (N=60)	OR 值	p 值	aOR
年齡 ^a	46.7 ± 10.2	47.3 ± 11.4	-	0.75	-
乳癌分期 ^b					
第一期	13 (26.0%)	-	-	-	-
第二期	31 (62.0%)	-	-	-	-
第三期	6 (12.0%)	-	-	-	-
抽煙					
無	59 (98.3%)	59 (98.3%)	1.0		-
有	1 (10.7%)	1 (10.7%)	1.0	1.0	
教育程度 ^b					
大學以下	54(95.0%)	57(96.4%)			
大學以上	2(5.0%)	3(3.6%)	0.7	0.71	NS
身體質量指數					
25 以下	43 (71.7%)	40 (71.7%)	1.0		-
25 以上	17 (28.3%)	20 (28.3%)	0.8	0.55	NS
家族史					
無	57 (95.0%)	57 (95.0%)	1.0		-
有	3 (5.0%)	3 (5.0%)	1.0	1.0	
初經年齡 ^b					
13 歲以上	35 (63.6%)	47 (78.3%)	1.0		3.2
13 歲以下	20 (36.4%)	13 (21.7%)	2.1	<0.05	(1.1-9.5)
停經狀態					
停經前	37 (61.7%)	41 (68.3%)	1.0		4.7
停經後	23 (38.3%)	19 (31.7%)	1.3	0.44	(1.5-14.4)
哺乳史 ^b					
有	29 (50.0%)	46 (78.0%)	1.0		9.1
無	29 (50.0%)	13 (22.0%)	3.5	<0.05	(2.8-29.8)
第一胎足月生產年齡					
30 歲以上	43 (71.7%)	49 (81.7%)	1.0		
30 歲以上或未曾生產	17 (28.3%)	11 (18.3%)	1.7	0.14	NS
足月生產數 ^b					
3 胎以上	14 (23.3%)	15 (25.4%)	1.0		
1 到 3 胎	39 (65.0%)	39 (66.1%)	1.1		NS
無	7 (11.7%)	5 (8.5%)	1.6	0.84	NS
使用口服避孕藥 ^b					
無	51 (86.4%)	57 (96.6%)	1.0		
有	8 (13.6%)	2 (3.4%)	4.5	<0.05	NS
使用荷爾蒙補充療法 ^b					
無	46 (76.7%)	52 (88.1%)	1.0		
有	14 (23.3%)	7 (11.9%)	2.3	0.1	NS

NS:無統計上顯著相關

^a:年齡用 t-test 檢測^b:研究對象之資料有 missing data, 則該樣本被刪除

用 ÷2-test 計算 p 值與 OR 值, 以 logistic regression 計算 aOR 值

表二 乳癌患者組與健康對照組 NAT2 基因型分佈

	乳癌患者組 (N=60)	健康對照組 (N=60)
快型	45	47
NAT2*4 / NAT2*4	23	18
NAT2*5 / NAT2*4	4	2
NAT2*6 / NAT2*4	9	16
NAT2*7 / NAT2*4	9	11
慢型	15	13
NAT2*5 / NAT2*5	5	1
NAT2*6 / NAT2*6	3	3
NAT2*7 / NAT2*7	2	2
NAT2*5 / NAT2*6	0	0
NAT2*5 / NAT2*7	1	1
NAT2*6 / NAT2*7	4	6

NAT2 PCR 產物以三種酵素分型，分為 NAT2*4 (野生型)，
 NAT2*5 (M1 ; 以 Kpn I 酵素分型)，NAT2*6 (M2 ; 以 Taq I 酵素分型)，
 NAT2*7 (M3 ; 以 BamHI 酵素分型)，

表三 易感性多型性基因之分佈與比較

基因型	乳癌病患組 (N=60)	健康對照組 (N=60)	OR 值	P 值	aOR	95% C.I
CYP1A1 MspI						
野生/野生型			1.0			
及野生/變異型	50 (83.3%)	49 (81.7%)				
變異/變異型	10 (16.7%)	11 (18.3%)	0.9	0.81	0.9	(0.3 - 2.3)
NAT2						
快型	45 (75.0%)	47 (78.3%)	1.0			
慢型	15 (25.0%)	13 (21.7%)	1.2	0.67	1.1	(0.5 - 2.7)
GSTM1						
GSTM1 非無效型	26 (43.3%)	35 (58.3%)	1.0			
GSTM1 無效型	34 (56.7%)	25 (41.7%)	1.8	0.1	1.8	(0.9 - 3.8)
GSTT1						
GSTT1 非無效型	33 (55.0%)	34 (56.7%)	1.0			
GSTT1 無效型	27 (45.0%)	26 (43.3%)	1.0	1.0	1.0	(0.5 - 2.2)

OR=odds ratio

AOR=adjusted odds ratio, 使用 logistic regression , 以表中四種基因型為自變項

C.I = 信賴區間

表四 危險因子與基因型分析迴歸分析

變項	OR	95% C.I
初經年齡 (13 歲以下 / 13 歲以上)	2.8	(1.1-7.2)
停經期 (停經後 / 停經前)	3.0	(1.1-8.1)
哺乳史 (無 / 有)	2.1	(2.1-14.8)
使用口服避孕藥 (有 / 無)	3.2	(1.0-10.6)
CYP1A1 MspI (變異/變異型 / 野生/野生型 及 野生/變異型)	0.7	(0.2-2.0)
GSTM1 (無效型 / 非無效型)	2.0	(0.8-4.7)
GSTT1 (無效型 / 非無效型)	1.0	(0.4-2.1)
NAT2 (慢型 / 快型)	1.4	(0.5-3.6)

OR=odds ratio

aOR=adjusted odds ratio, 使用 logistic regression 分析

C.I = 信賴區間

表五 DPC 與乳癌患者的相關性

	乳癌病患組		健康對照組		p 值
	個案數	Mean ± SD	個案數	Mean ± SD	
DPC (%)					
全體	60	1.6 ± 0.4	60	1.0 ± 0.3	P<0.001
停經前	37	1.6 ± 0.4	41	1.0 ± 0.3	P<0.001
停經後	23	1.7 ± 0.5	19	1.0 ± 0.3	P<0.001

以 t-test 分析均達統計上顯著差異

乳癌患者停經前後 p 值=0.68

健康對照停經前後 p 值=0.76

表六 DPC 與乳癌分期的相關性

	乳癌病患組		健康對照組		p 值
	個案數	Mean \pm SD	個案數	Mean \pm SD	
DPC (%)					
第一期	13	1.6 \pm 0.3	60	1.0 \pm 0.3	P<0.001
第二期	31	1.6 \pm 0.5	60	1.0 \pm 0.3	P<0.001
第三期	6	1.7 \pm 0.5	60	1.0 \pm 0.3	P<0.001

以 t-test 分析乳癌病患組與健康對照組均達統計上顯著差異

乳癌患者第一期與第二期 p 值=0.68

乳癌患者第一期與第三期 p 值=0.50

乳癌患者第二期與第三期 p 值=0.79

表七 乳癌患者基因型與 DPC 的比較

基因型	乳癌病患組			健康對照組		
	個案數	Mean ± SD	p 值	個案數	Mean ± SD	p 值
CYP1A1 Msp I						
野生/野生型						
及野生/變異型	50	1.6 ± 0.4	0.26	49	1.0 ± 0.3	0.76
變異/變異型	10	1.8 ± 0.6		11	1.0 ± 0.3	
NAT2						
快型	45	1.6 ± 0.4	0.39	47	1.0 ± 0.3	0.44
慢型	15	1.7 ± 0.5		13	0.9 ± 0.3	
GSTM1						
GSTM1 非無效型	26	1.7 ± 0.4	0.20	35	1.0 ± 0.4	0.95
GSTM1 無效型	34	1.6 ± 0.5		25	1.0 ± 0.3	
GSTT1						
GSTT1 非無效型	33	1.6 ± 0.5	0.38	33	1.0 ± 0.3	0.61
GSTT1 無效型	27	1.7 ± 0.4		27	1.0 ± 0.3	

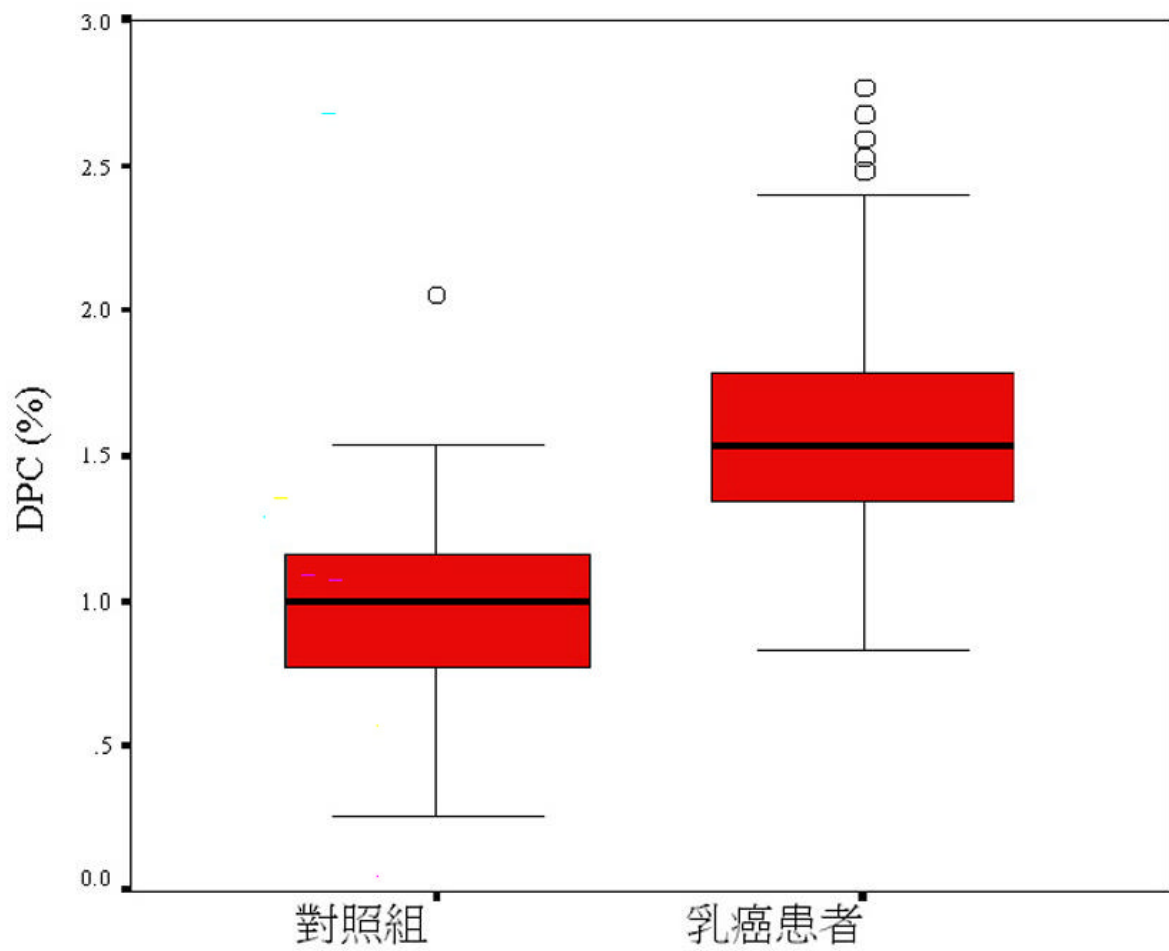
使用 t-test 均無統計上的顯著差異

表八 DPC 之多變項迴歸分析

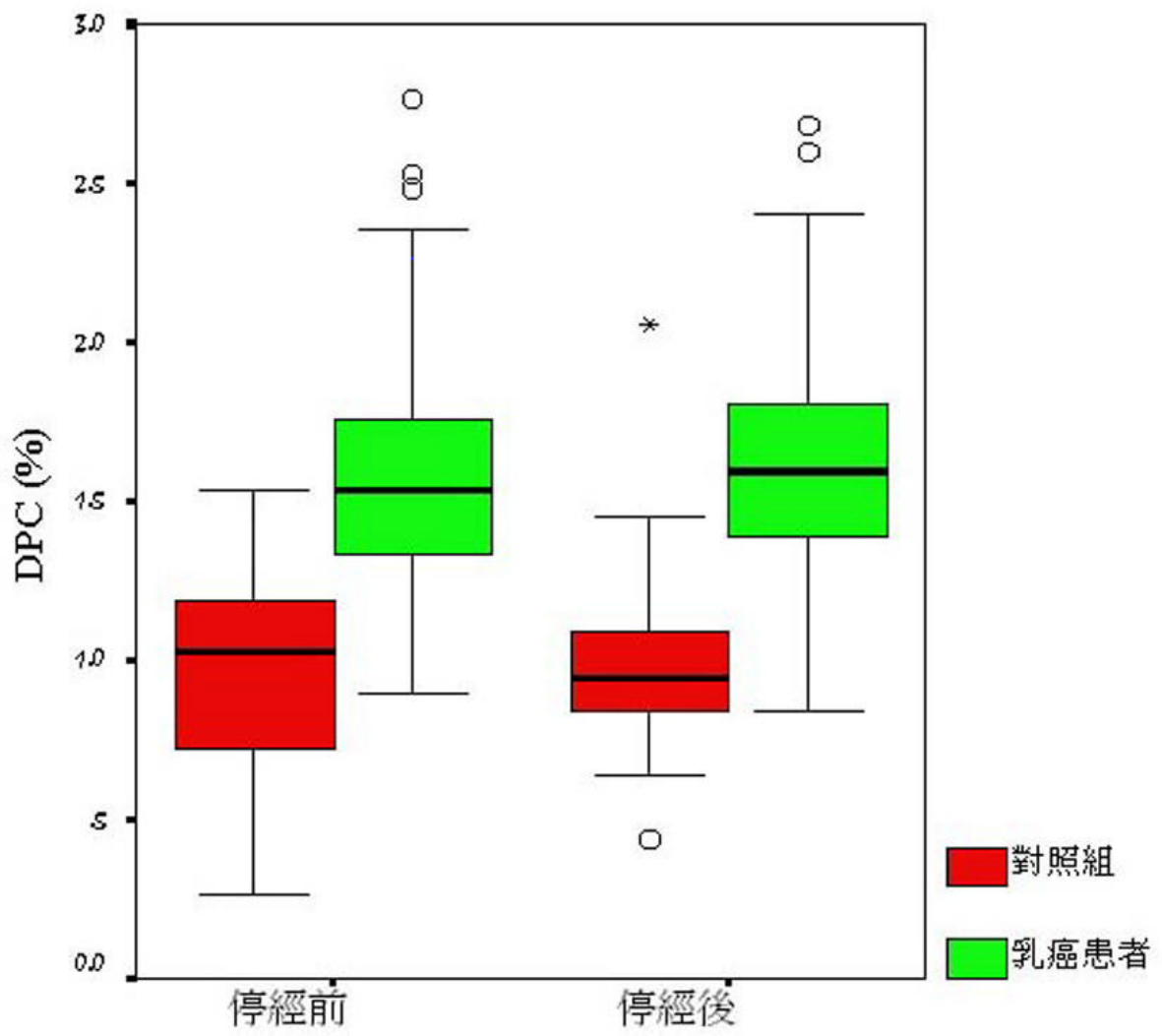
變項	迴歸係數	P 值
疾病 (乳癌患者組 / 健康對照組)	0.66	<0.01
教育程度 (大學以下 / 大學以上)	-0.08	0.68
身體質量指數 (25 以上 / 25 以下)	-0.11	0.26
初經年齡 (13 歲以下 / 13 歲以上)	0.15	0.13
停經期 (停經後 / 停經前)	0.13	0.21
哺乳史 (無 / 有)	-0.06	0.58
第一胎足月生產年齡 (30 歲以上或未曾生產 / 30 歲以上)	-0.11	0.33
足月生產數 (無 / 三胎以上)	0.19	0.33
(一到三胎 / 三胎以上)	0.06	0.56
使用避孕藥 (有 / 無)	0.25	0.11
使用女性荷爾蒙 (有 / 無)	-0.14	0.22
CYP1A1 Msp I (變異/變異型 / 野生/野生型 及 野生/變異型)	0.02	0.88
GSTM1 (無效型 / 非無效型)	-0.12	0.15
GSTT1 (無效型 / 非無效型)	-0.01	0.93
NAT2 (慢型 / 快型)	0.04	0.67

$R^2=0.47$ ($P<0.01$)

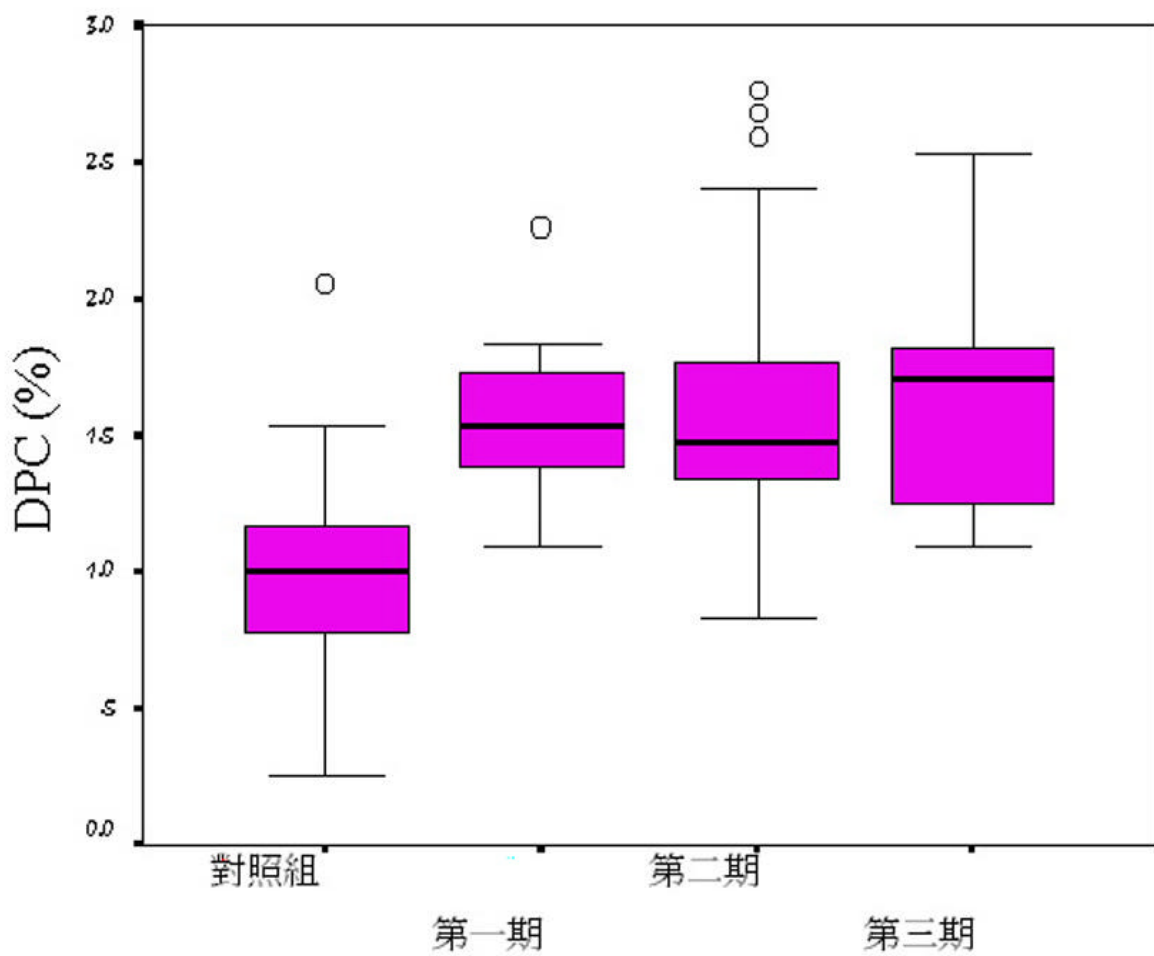
以逐步迴歸法 (stepwise) 作多變項迴歸分析，則只有疾病變項留於迴歸模型 (model) 中 ($R^2=0.42$)。



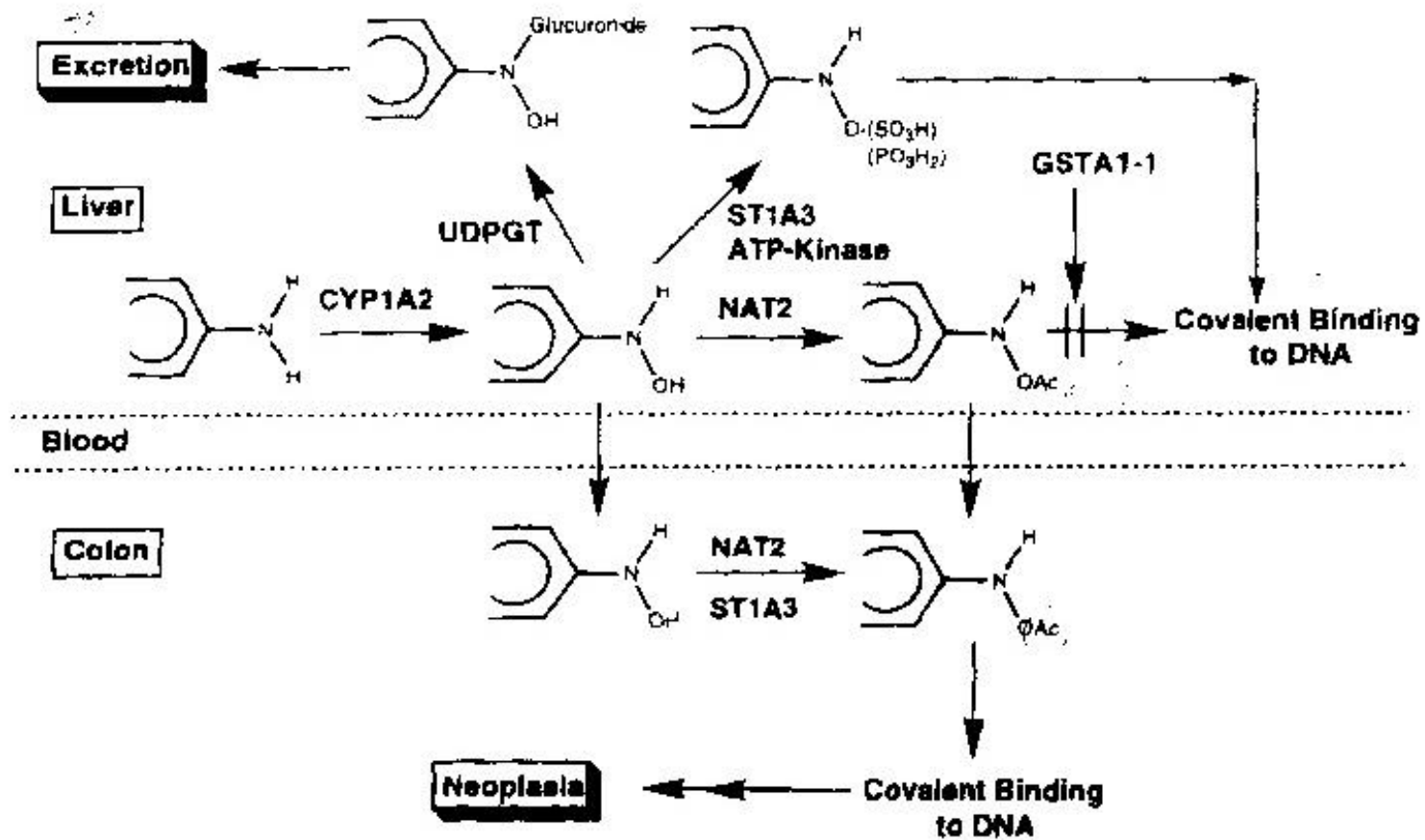
圖一、DPC 在乳癌患者與健康對照組的分佈



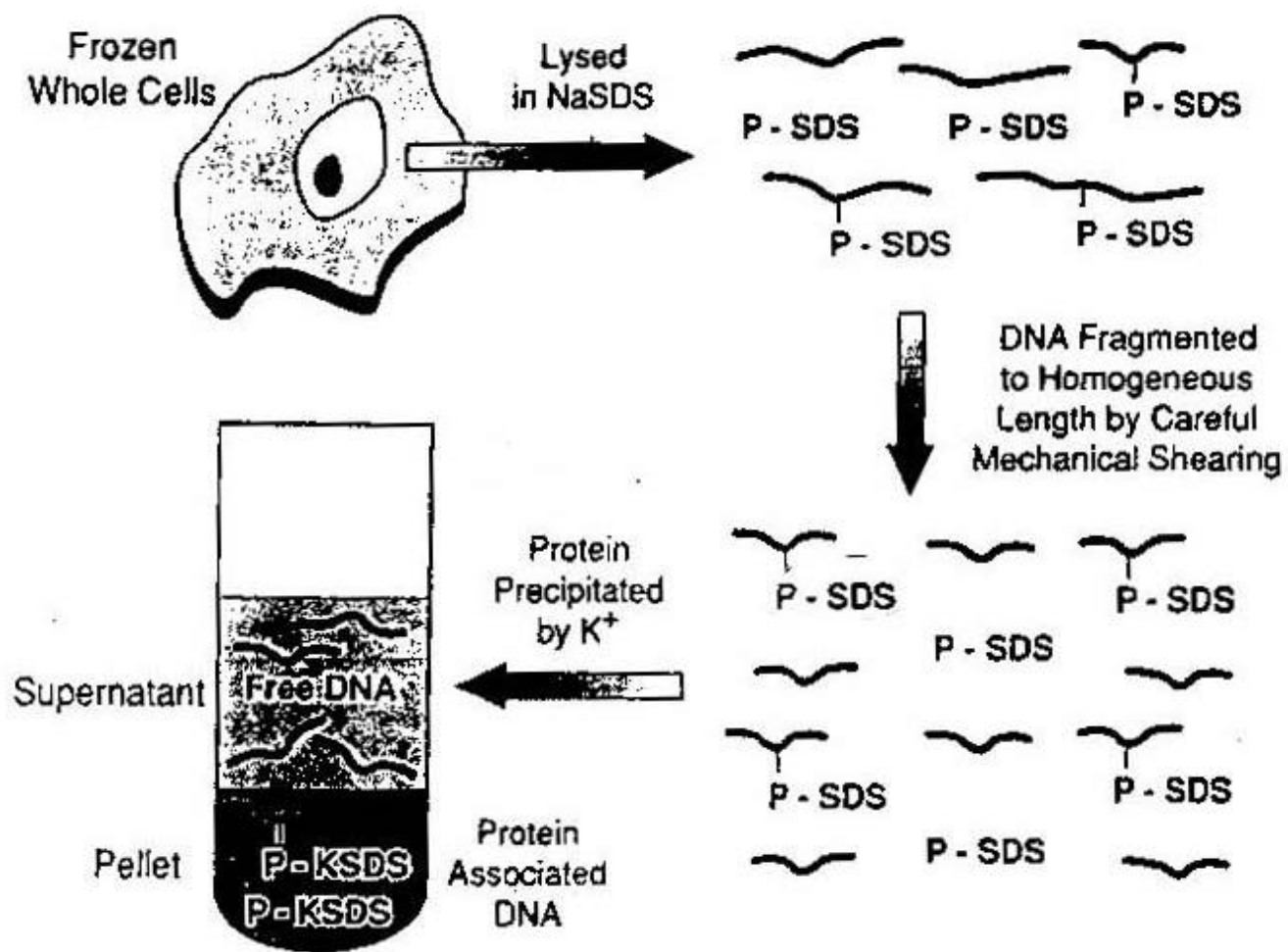
圖二、停經前後 DPC 在兩組間分佈



圖三、乳癌分期與對照組 DPC 的分佈



附錄一、酵素代謝機轉



附錄二、DPC 實驗操作步驟

附錄三、癌症分期

癌症分期的目的在於在臨床的基礎上，能提供醫生間一個共同描述癌症深度的標準，使其成為一種國際通用的語言。制定這種標準的機關有二，分別是癌症國際中心聯盟（Union International Centre Le cancer; UICC）與癌症分期及最後結果報告美國聯合委員會（American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting; AJCCS）。

UICC 與 AJCCS 均採用 TNM 分類法：

T 項為對原發性腫瘤的狀況加以定義⁽⁷⁾：

- (1) T0：無原發性腫瘤
- (2) TIS：原發性腫瘤
- (3) T1, T2, T3, T4：腫瘤大小及侵犯部位遞增
- (4) TX：無法估計腫瘤

N 項即表示局部性淋巴結的狀況：

- (1) N0：局部性淋巴結無明顯異常
- (2) N1, N2, N3：局部性淋巴結異常程度遞增
- (3) N1a：局部淋巴結與轉移
- (4) N1b：局部淋巴結類似或證明轉移
- (4) NX：無法估計

M 項表示轉移程度：

- (1) M0：無遠端轉移
- (2) M1, M2, M3：遠端轉移程度遞增，包括遠端轉移

附錄四、問卷（乳房腫瘤病患）

一、基本資料

- 1、病例號碼：_____ 聯絡電話：(____)_____
- 2、診斷結果：_____
- 3、姓名：_____ 目前住址：_____
- 4、出生年月日：民國____年____月____日
- 5、籍貫：(1) 閩南 (2) 外省 (3) 客家 (4) 原住民 (5) 其他
- 6、職業：(1) 軍 (2) 公 (3) 教 (4) 農業 (5) 工
(6) 商 (7) 自由業 (8) 家管 (9) 學生
(10) 其他_____
- 7、教育程度：(1) 不識字 (2) 國小 (3) 國中
(4) 高中(職) (5) 專科 (6) 大學
(7) 研究所以上
- 8、結婚狀況：(1) 未婚 (2) 已婚 (3) 離婚 (4) 喪偶
(5) 分居
- 9、是否有懷孕：(答“無”者，跳答第 10 題)
(1) 無
(2) 有，第一胎的年齡：_____歲；懷孕次數：_____次；
生育次數：_____次；人工流產：_____次
- 10、是否有哺育母乳：(1) 有，共幾胎____胎 (2) 無
- 11、初經年齡（幾歲）：_____歲
- 12、停經：(1) 否 (2) 是，幾歲____歲
- 13、身高：_____公分；體重：_____公斤

二、生活習慣

(一) 抽菸習慣

- 1、(1) 不抽 (2) 不抽，但經常吸二手菸
(3) 以前抽，現已戒菸 (4) 每週 1-3 次
(5) 每週 4-5 次每天抽

【選擇“不抽”者，跳答第(二)】

- 2、您抽菸已抽幾年了？（戒菸者，依過去情況回答）

- (1) 未滿一年 (2) 一年至三年
(3) 三年至五年 (4) 五年至十年
(5) 十年以上

- 3、若答戒菸者，您戒菸幾年了？

- (1) 未滿一年 (2) 一年至三年
(3) 三年至五年 (4) 五年至十年
(5) 十年以上

- 4、您平均每天抽多少菸？（戒菸者，依過去情況回答）

- (1) 五支以內 (2) 五之至十支（半包）
(3) 半包至一包 (4) 一包以上

(二) 喝酒習慣

- 1、您喝酒嗎？

- (1) 不喝或每週少於一次 (2) 以前喝，現已戒酒

- (3) 每週 1-2 次 (4) 每週 3-4 次
(5) 每天喝

【選擇“不喝或每週少於一次”者，跳答第(三)】

2、您喝酒已喝幾年了？(戒酒者，依過去情況回答)

- (1) 未滿一年 (2) 一年至三年
(3) 三年至五年 (4) 五年至十年
(5) 十年以上

3、若答戒酒者，您戒酒幾年了？

- (1) 未滿一年 (2) 一年至三年
(3) 三年至五年 (4) 五年至十年
(5) 十年以上

4、您每次的喝酒習慣為何？(戒酒者，依過去情況回答)

(1 杯相當於 150c.c.或 1 紙杯量)

- (1) 淺嚐(少於半杯) (2) 小酌(半杯到一杯)
(3) 二杯到三杯 (4) 四杯或以上

(三) 喝茶與咖啡的習慣

1、您有喝茶的習慣嗎？(每週至少有一次以上)

- (1) 沒有
(2) 偶爾(每週 1-3 次), 喝幾年: _____ 平均每次喝多少: _____
(3) 有(每週 3 次以上), 喝幾年: _____ 平均每次喝多少: _____

2、您有喝咖啡的習慣嗎？(每週至少有一次以上)

- (1) 沒有
(2) 偶爾(每週 1-3 次), 喝幾年: _____ 平均每次喝多少: _____
(3) 有(每週 3 次以上), 喝幾年: _____ 平均每次喝多少: _____

(四) 最近一年是否有經常服用營養品或健康食品習慣？

(1) 有(每週至少有三次以上)

- (a) 維他命 A (b) 維他命 C (c) 維他命 E
(d) 綜合維他命 (e) 人參
(f) 中藥: 八寶散 牛黃散 救寶散 驚風散 其他 _____
(g) 其他 _____

(2) 沒有

(五) 您是否吃檳榔的習慣？

- (1) 不吃 (2) 以前吃現已戒 (3) 每週 1-3 次
(4) 每週 4-5 次 (5) 每天吃

(六) 飲食習慣

無: 不吃或每週少於一次 很少: 每週 1-3 次 偶而: 每週 4-6 次

經常: 每天 1 次 總是: 每天吃 2 次或以上

無 很少 偶而 經常 總是

肉類食品(豬、牛、羊等)

海鮮食品(魚類等)

內臟食品(豬肝、雞心等)

脂肪類食物

蔬菜食品

水果類食品

三、工作史

1、目前是否有在外工作？

- (1) 有，從事何種工作？_____共幾年__年
在此工作之前有無從事其他工作？
(a) 有，最長的是哪一個工作？_____共幾年__年
(b) 無
- (2) 已辭去工作；辭去之前從事哪些工作？_____前一個最長的工作？_____共幾年__年
- (3) 沒有

2、工作場所中是否有暴露於有害物質，影響您的健康？

- (1) 有，暴露於何種有害物質？_____
- (2) 沒有

四、疾病史

1、現在病史

(1) 目前是否還有服用藥物：

- (a) 沒有
- (b) 有，何種？_____
- _____

(2) 目前是否有服用女性賀爾蒙藥物：

- (a) 沒有
- (b) 有，服用多久？____年____月

(3) 目前是否有服用避孕藥的習慣：

- (a) 沒有
- (b) 有，服用多久？____年____月

2、您是否曾患有其他疾病（經醫師診斷）

(1) 有

- (a) 乳癌 (b) 子宮頸癌 (c) 卵巢癌
(d) 糖尿病 (e) 高血壓 (f) 心臟病 (g) 痛風
(h) 肝炎 (A、B、C) (i) 其他_____
- 時間多久？____年____月

(2) 沒有

3、您以前是否曾經接受過乳房 X 光檢查

- (1) 有
共幾次____次；分別在幾歲時作的_____

(2) 沒有

4、請問您是否接受過卵巢摘除術

- (1) 有
在____歲時候進行，摘除了__ (1) 一側 (2) 二側
之後您有沒有接受賀爾蒙治療？ 有，治療____年； 沒有

(2) 沒有

5、請問您是否接受過子宮摘除術

- (1) 有
在____歲時候進行

是什麼原因進行摘除術？___ (1) 子宮頸癌 (2) 子宮內肌癌 (3) 子宮肌瘤 (4) 其他

(2) 沒有

6、請問您是否做過乳房組織針刺 (切片) 檢查

(1) 有

請問您做過___次，分別在___歲 (及___歲) 時做的

做的結果是___ (1) 囊腫 (2) 發炎 (3) 正常 (4) 良性瘤 (5) 惡性瘤

(2) 沒有

7、是否有家人罹患下列疾病？

(1) 有

(a) 乳癌 與您的關係？_____

(b) 子宮頸癌 與您的關係？_____

(c) 卵巢癌 與您的關係？_____

(d) 糖尿病 與您的關係？_____

(e) 高血壓 與您的關係？_____

(f) 心臟病 與您的關係？_____

(g) 痛風 與您的關係？_____

(h) 肝炎 與您的關係？_____

(2) 沒有